

Institut für Lebensmittelsicherheit und -hygiene
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

Direktor: Prof. Dr. Roger Stephan

**Untersuchungen zum Wachstum und zur Persistenz von *Escherichia coli*
O26:H11, O157:H7, O157:H45 und O159:H⁻ in Bezug auf Säurestress**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

vorgelegt von

Timo Nauer

Tierarzt
von Unteriberg, Schweiz

genehmigt auf Antrag von

Prof. Dr. Roger Stephan, Referent

PD Dr. Barbara Schalch, Korreferentin

Zürich 2009

meinen Eltern
Verena und Ulrich Nauer

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung/Summary	Seite 1
2	Einleitung	Seite 3
3	Literaturübersicht	Seite 4
3.1	Shigatoxin-bildende <i>E. coli</i> - Übersicht	Seite 4
3.2	STEC-Situation in der Europäischen Union (EU)	Seite 5
3.3	Säureresistenz von STEC	Seite 6
3.3.1	Bedeutung aus lebensmittelhygienischer Sicht	Seite 6
3.3.2	Untersuchungen zur Säureresistenz von STEC in sauren Lebensmitteln	Seite 8
3.3.2.1	Fruchtsäfte	Seite 8
3.3.2.2	Fermentierte Rohwürste	Seite 9
3.3.2.3	Fermentierte Milchprodukte	Seite 9
3.3.2.4	Mayonnaise	Seite 10
3.3.3	Molekulare Grundlagen der Säureresistenz	Seite 11
3.3.3.1	Oxidatives System und RpoS	Seite 11
3.3.3.2	Glutamat- und Arginin-abhängiges System	Seite 12
3.3.3.3	Weitere potentielle Säureresistenzfaktoren/-mechanismen	Seite 12
4	Material und Methoden	Seite 13
4.1	Bakterienstämme	Seite 13
4.2	Säuren und pH-Wert	Seite 13
4.3	Materialübersicht	Seite 14
4.4	Wachstumsversuche	Seite 14
4.5	Reduktionsversuche	Seite 15
4.5.1	<i>E. coli</i> -Stämme in der stationären Wachstumsphase	Seite 15
4.5.2	<i>E. coli</i> -Stämme in der logarithmischen Wachstumsphase	Seite 15
4.5.3	<i>E. coli</i> -Stämme in der stationären Wachstumsphase nach Adaptation an Säurestress	Seite 15
4.6	Keimzahlbestimmung	Seite 16

5	Ergebnisse & Diskussion	Seite 17
5.1	Allgemeines	Seite 17
5.2	Wachstumsversuche	Seite 17
5.3	Reduktionsversuche	Seite 19
5.3.1	Vergleich des Reduktionsverhaltens der Teststämme in der stationären und logarithmischen Wachstumsphase	Seite 19
5.3.2	Vergleich des Reduktionsverhaltens von säureadaptierten und nicht adaptierten Teststämmen in der stationären Wachstumsphase	Seite 21
5.4	Schlussfolgerungen	Seite 23
6	Abbildungen	Seite 24
7	Literaturverzeichnis	Seite 36
8	Dank	Seite 50

1 Zusammenfassung

Shigatoxin-bildende *E. coli* (STEC) gehören neben *Campylobacter* und *Salmonellen* zu den wichtigsten Erregern von Lebensmittelinfektionen. Unter den erkrankungsassoziierten Lebensmitteln finden sich auch gesäuerte oder fermentierte Produkte, was auf eine mögliche erhöhte Säureresistenz von STEC hinweist. In der vorliegenden Arbeit wurde an vier darmpathogenen *E. coli*-Stämmen (STEC O157:H7, STEC O26:H11, STEC O159:H⁻, EPEC O157:H45) sowie einem Kontrollstamm (*E. coli* K12) das Wachstums- und Reduktionsverhalten unter Säurestress (Salz-, Essig-, Milchsäure) untersucht.

In den Wachstumsversuchen zeigten der O157:H45-Stamm bei Salzsäure und Essigsäure-Zusatz und der O157:H7-Stamm bei Salzsäure-Zusatz eine erhöhte Säuretoleranz, während die übrigen Stämme keine Unterschiede aufwiesen. In den Reduktionsversuchen lagen deutliche Unterschiede zwischen Stämmen der stationären und der logarithmischen Wachstumsphase vor. Auffällig waren die Unterschiede in der Koloniegrösse nach extremem Säurestress (pH 2.5-3.5). Im Vergleich der drei Säuren erwies sich der Zusatz von Essigsäure als am effektivsten für eine Wachstumshemmung und eine Keimzahlreduktion, gefolgt von Milch- und Salzsäure. Zudem zeigte der Vergleich des Reduktionsverhaltens von säureadaptierten und nicht adaptierten *E. coli* O157:H7, *E. coli* O159:H⁻ und *E. coli* K12 eine erhöhte Säureresistenz der mit Salzsäure adaptierten Stämme, während dies nach Adaptation mit Milchsäure nicht der Fall war. Die Adaptation mit Essigsäure führte nur bei gewissen Stämmen zu einer erhöhten Säureresistenz. Bei der "stress response" von enteropathogenen *E. coli* auf Säurestress scheinen daher grosse Stammunterschiede zu bestehen, die vor allem von der verwendeten Säure und weniger vom Serotyp oder dem Muster an Virulenzfaktoren der Stämme abhängen.

Summary

Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) are a major cause of foodborne diseases in humans. STEC infections have also been associated with acidified or fermented products. This fact may indicate an increased acid resistance of STEC. In addition, it has been shown that exposition to acidified foods can further improve the acid resistance of STEC. In the present study, four pathogenic *E. coli* strains (STEC O157:H7, STEC O26:H11, STEC O159:H⁻, EPEC O157:H45) and one control strain (*E. coli* K12) were examined for growth and persistence under hydrochloric, acetic and lactic acid stress.

In the growth experiments, the O157:H45 strain (hydrochloric and acetic acid) and the O157:H7 strain (acetic acid) showed improved acid resistance, whereas no differences were evident for the other strains. In the survival experiments, significant differences were found between strains in the stationary and logarithmic growth phase. Striking was the difference in the colony size after acid stress (pH 2.5-3.5). Thereby, the colony size of *E. coli* O157:H7/H45 was least affected. By comparison of the three acids, acetic acid proved to be most effective for growth inhibition and inactivation of the different strains, followed by lactic acid and hydrochloric acid. The comparison of acid adapted and non adapted *E. coli* O157:H7, *E. coli* O159:H⁻ and *E. coli* K12 showed that strains adapted with hydrochloric acid exhibited improved acid resistance, but this effect was not confirmed after lactic acid adaptation. The adaptation with acetic acid improved the acid resistance of *E. coli* O159:H⁻ and *E. coli* K12, whereas that of *E. coli* O157:H7 was not affected. Consequently, remarkable strain-to-strain variation in the acid stress response of "enteropathogenic" *E. coli* was evident. This variation was rather influenced by the acid applied than by the serotype or the pattern of virulence factors of the strains.

2 Einleitung

Beim Menschen gehören Shigatoxin-bildende *Escherichia coli* (STEC) weltweit neben *Salmonella* spp., *Yersinia* spp. und *Campylobacter* spp. zu den wichtigsten Erregern von so genannten "foodborne diseases".

Neben Hackfleischprodukten, im speziellen Hamburgern, und Rohmilch, die als Hauptinfektionsquelle für STEC-Infektionen des Menschen gelten, werden in der Literatur häufiger auch Krankheitsausbrüche, die mit dem Verzehr von kurzgereiften Rohwürsten, Joghurt, Apfelsaft und Wasser assoziiert sind, beschrieben. Dies erstaunt, da sich unter diesen Produkten nicht nur rohe bzw. nicht durcherhitzte Lebensmittel befinden, sondern auch gesäuerte und fermentierte Lebensmittel mit einem tiefen pH-Wert. Dies weist auf eine mögliche erhöhte Säureresistenz von STEC hin. In der Tat wurde in verschiedenen Literaturarbeiten die Persistenz von STEC, insbesondere von solchen des Serotyps O157:H7, beschrieben. Zudem wurde gezeigt, dass bei *E. coli* O157:H7-Stämmen durch Exposition in angesäuerten Lebensmitteln oder durch Präkonditionierung in angesäuerten Labormedien eine vermehrte Säuretoleranz induziert werden kann ("Adaptation"). Die "stress response"-Mechanismen, die bei STEC-Stämmen diese Säuretoleranz bewirken, sind jedoch bis anhin nur ungenügend bekannt. Zudem scheinen möglicherweise Stammunterschiede in Bezug auf die Säureresistenz wichtiger zu sein, als die Zugehörigkeit von Stämmen zu einem bestimmten Serovar oder zu Stämmen mit einem bestimmten Muster an Virulenzfaktoren.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden an vier darmpathogenen *E. coli*-Stämmen (STEC O157:H7, STEC O26:H11, STEC O159:H⁻, EPEC O157:H45) sowie einem Laborkontrollstamm (*E. coli* K12) Untersuchungen zum Wachstums- und Reduktionsverhalten dieser Stämme unter Säurestress (Salzsäure, Essigsäure, Milchsäure) durchgeführt. Diese Untersuchungen sollen auf der einen Seite weitere Daten für "predictive microbiology"-Modelle liefern. Auf der anderen Seite bilden sie die Grundlage für eine weiterführende Arbeit, im Rahmen derer basierend auf den Daten dieser Arbeit zwei Stämme ausgewählt werden, bei denen über eine Transposon-Library die Mechanismen der Säureresistenz weitergehend beschrieben werden sollen.

3 Literaturübersicht

3.1 Shigatoxin-bildende *Escherichia coli* - Übersicht

Escherichia (E.) coli gehört zu den mehr als einhundert Bakterienarten, aus denen sich die normale Darmflora von gesunden Menschen und Tieren zusammensetzt. Während die meisten *E. coli*-Stämme apathogen sind, können bestimmte Stammvarianten intestinale oder extraintestinale Krankheiten auslösen. Anhand ihrer Pathogenitätsmerkmale werden darmpathogene *E. coli* in neun verschiedene Gruppen eingeteilt (Tabelle 1).

Tabelle 1: Einteilung darmpathogener *E. coli* (Nataro und Kaper 1998)

Gruppe	Hauptvirulenzfaktoren	Erkrankungen
Enterotoxigene <i>E. coli</i> (ETEC)	Adhäsionsfaktoren, Enterotoxine	Reisediarrhoe
Enteroinvasive <i>E. coli</i> (EIEC)	Zellinvasionsfähigkeit	Dysenterie
Enteropathogene <i>E. coli</i> (EPEC)	Adhäsionsfaktoren	Säuglingsdiarrhoe
Attaching and effacing <i>E. coli</i> (AEEC)	Adhäsionsfaktoren	Diarrhoe
Shigatoxin-bildende <i>E. coli</i> (STEC)	Shigatoxine, Adhäsionsfaktoren Enterohämolysin	Diarrhoe, HC, HUS, TTP
Diffus-adhäsive <i>E. coli</i> (DAEC)	Adhäsionsfaktoren	Diarrhoe
Enteroaggregative <i>E. coli</i> (EAEC)		
Cytolethal-Distending-Toxin-bildende <i>E. coli</i> (EDTEC)	Toxinbildung	Diarrhoe
Nekrotoxische <i>E. coli</i> (NTEC)	Zytonekrosefaktor	Diarrhoe

Unter diesen darmpathogenen *E. coli*-Stämmen besitzen die Shigatoxin-bildenden aus lebensmittelhygienischer Sicht eine spezielle Bedeutung. Shigatoxin-bildende *E. coli* (STEC; in der Literatur auch als Verotoxin-bildende *E. coli* (VTEC) bezeichnet) wurden 1982 erstmals als "emerging foodborne pathogen" beschrieben (Riley et al. 1983). Sowohl aus Stuhlproben der damals erkrankten Patienten als auch aus nicht ausreichend erhitzten Hamburgern konnten *E. coli* O157:H7 isoliert werden. Die Erkrankung wurde in der Folge auch als "hamburger disease" bezeichnet. Seither traten auch in vielen anderen Ländern wie beispielsweise Kanada, Grossbritannien, Frankreich, Italien und Deutschland Lebensmittel-bedingte STEC-Infektionen als Massenausbrüche oder als sporadische Einzelerkrankungen auf (MacDonald et al. 1996, Mead et al. 1997, Slutsker et al. 1997). Der bisher weltweit grösste Krankheitsausbruch wurde 1996/1997 aus Japan mit über 10'000 Erkrankten gemeldet (Yukioka und Kurita 1997, Michino et al. 1999).

Aufgrund von Multilocus-Sequenzanalysen wurden *E. coli* O157-Stämme zusammen mit EPEC der Serogruppe O55 einem gemeinsamen Cluster zugeordnet (Whittam und Wilson 1988, Feng et al. 1998). Zur Entstehung pathogener STEC-Stämme werden Mechanismen des horizontalen Gentransfers diskutiert, da viele der bekannten Virulenzfaktoren auf genetisch mobilen Elementen wie Phagen (die Shigatoxine), einer so genannten Pathogenitätsinsel oder Plasmiden codiert sind (Perna et al. 1998, Boerlin et al. 1999).

STEC-Infektionen können beim Menschen zu Gastroenteritis mit Diarrhöe und in schweren Fällen zu "Hämorrhagischer Colitis" (HC) führen. Zudem kann als lebensbedrohliche Komplikation ein "Hämolytisch-Urämisches Syndrom" (HUS) auftreten (Karmali 1989, Karch et al. 2005, Tarr et al. 2005). Pathogene STEC-Stämme gehören zu einer grossen, stetig wachsenden Zahl von O:H Serotypen. Die meisten Ausbrüche und sporadische Fälle von HC und HUS werden, insbesondere in den USA, Kanada und Japan, mit dem Serotyp O157:H7 assoziiert (Johnson et al. 2006). Allerdings sind auch, insbesondere in Europa, non-O157 STEC für schwerwiegende humane Erkrankungen verantwortlich (Johnson et al. 1996, Tarr und Neill 1996, Beutin et al. 1998, Nataro und Kaper 1998, Eklund et al. 2001, Beutin et al. 2004). Als Beispiele seien Stämme der Serotypen O26:H11/H⁻, O91:H21/H⁻, O103:H2, O111:H⁻, O113:H21, O117:H7, O118:H16, O121:H19, O128:H2/H⁻, O145:H28/H⁻ oder auch O146:H21 genannt. Die Übertragung von STEC auf den Menschen erfolgt hauptsächlich über fäkal kontaminierte Lebensmittel. Ebenfalls von Bedeutung sind Schmierinfektionen (Mensch-Mensch respektive Tier-Mensch) sowie Infektionen über Schwimmbad- und Trinkwasser (Werber et al. 2007).

3.2 STEC-Situation in der Europäischen Union (EU)

Im europäischen Raum wurden im Jahre 2006 insgesamt 4'916 humane STEC-Infektionen verzeichnet. Dies entspricht einer Inzidenz von 1.1 pro 100'000 Einwohnern (EFSA 2007). Die gemeldeten Fälle stammten aus 22 EU-Staaten, wobei mit 82% diejenigen aus England, Deutschland und Tschechien den Hauptteil ausmachten. Über die Hälfte dieser Infektionen wurde bei Kindern unter fünf Jahren diagnostiziert. Bei den 4'916 Erkrankungsfällen wurden gehäuft die Serogruppen O157 (33.7%) und O26 (11.8%) gefunden. Das Auftreten von HUS als lebensbedrohliche Komplikation einer STEC-Infektion wurde dabei bei 126 Fällen verzeichnet, wobei wiederum Kinder unter fünf Jahren am häufigsten betroffen waren. Insgesamt wird die wahre Bedeutung von STEC-Infektionen in Europa und auch weltweit vermutlich unterschätzt, da viele Laboratorien keine routinemässigen Untersuchungen auf STEC durchführen.

Die Untersuchung von Lebensmitteln im Rahmen von Monitoring-Programmen auf STEC in verschiedenen europäischen Ländern ergab überwiegend geringe Nachweisraten (EFSA 2007). Dabei lag der Anteil positiver Proben für Rindfleisch durchschnittlich bei 1.4% (0-7.2%), für Schafffleisch bei 1.8% (0.7-11.1%), für Schweinefleisch bei 0.8%, für Rohmilch von Kühen bei 0.7% und für Rohmilchkäse bei 1.1% (0-16.2%). Bei der Untersuchung von Fruchtsaft, Gemüse, Eiern und Fischereiprodukten lagen lediglich bei letzteren positive Proben vor.

Zudem liegen von 14 EU-Mitgliedstaaten für das Jahr 2006 Daten zum Vorkommen von STEC bei Tieren (Rinder, Schweine, Geflügel, Ziegen, Schafe, Kaninchen, Hunde, Katzen) vor (EFSA 2007). STEC gehören zu den latenten Zoonose-Erregern, wobei gesunde Tiere als Reservoir dienen. Wenn sich auch weltweit Wiederkäuer als wichtigstes Reservoir erwiesen haben, wurden STEC in den letzten Jahren von verschiedenen Haus- und Wildtieren isoliert. Im Rahmen von Monitoring-Programmen wurden in der EU STEC am häufigsten bei Tieren der Rindergattung nachgewiesen (EFSA 2007). Dabei lag die Nachweisrate durchschnittlich bei 1.8% und schwankte zwischen den Mitgliedstaaten von 0 bis 13.7%. Von diesen 1.8% entfielen 0.4% auf die Serogruppe O157. Im Vergleich zu den Rindern lagen bei Schweinen, Ziegen und Schafen geringere Nachweisraten vor und bei Geflügel, Hunden und Katzen wurden keine STEC gefunden.

3.3 Säureresistenz von STEC

3.3.1 Bedeutung aus lebensmittelhygienischer Sicht

Eine bedeutende Eigenschaft von STEC ist ihre Säureresistenz (Conner und Kotrola 1995, Brudzinski und Harrison 1998, Diez-Gonzales und Russel 1999), die eine unbeschädigte Passage durch den sauren Mageninhalt ermöglicht (Roering et al. 1999, Naim et al. 2004, Tamplin 2005, Bergholz und Whittam 2007). Beispielsweise wurde gezeigt, dass viele STEC-Stämme einen pH-Wert von <2.5 über 2 h überleben (Benjamin und Datta 1996, Waterman und Small 1996). In der Studie von Roering et al. (1999) nahm die Keimzahl von *E. coli* O157:H7 in simuliertem Magensaft (pH 1.5) innerhalb von 2 h um 1.6 bis 2.8 log₁₀-Stufen ab, während *Salmonella* Typhimurium und *Listeria* (*L.*) *monocytogenes* nach 5 bis 30 min um >5.5 log₁₀-Stufen reduziert wurden. Diese Säureresistenz von STEC scheint auch ein wichtiger Grund für die niedrige minimale Infektionsdosis zu sein (Lin et al. 1995). Vermutlich reichen bereits 10 bis 100 Bakterien für das Angehen einer STEC-Infektion aus (Griffin und Tauxe 1991, Tuttle et al. 1999, Chart 2000, Teunis et al. 2004).

Diese Säuretoleranz ermöglicht es STEC, im Gegensatz zu anderen Lebensmittel-Infektionserregern, auch in sauren Lebensmitteln wie Apfelsaft, fermentierten Rohwürsten, Mayonnaise oder Sauermilcherzeugnissen zu überleben (Glass et al. 1992, Abdul-Raouf et al. 1993, Zhao et al. 1993, Miller und Kaspar 1994, Weagant et al. 1994, Zhao und Doyle 1994, Pozzi et al. 1996, Semanchek und Golden 1996, Calicioglu et al. 1997, Massa et al. 1997, Dineen et al. 1998, Getty et al. 2000, Riordan et al. 2000, Montet et al. 2009). Zu beachten ist zudem, dass durch den Einfluss eines tiefen pH-Werts eines Milieus, beispielsweise einem angesäuerten Lebensmittel, eine Säuretoleranz induziert werden kann (Goodson und Rowbury 1989, Leyer et al. 1995, Edelson 1996, Tsai und Ingham 1997, Abee und Wouters 1999, Jordan et al. 1999, Ryu et al. 1999, Berry und Cutter 2000, Samelis et al. 2005, Stopforth et al. 2007). Dies wurde auch für *E. coli* O157:H7 in angesäuerten Lebensmitteln nachgewiesen (Leyer et al. 1995, Edelson 1996, Ryu und Beuchat 1999). Eine solche Adaptation wird als "Acid Tolerance Response" (ATR) bezeichnet. Ein möglicher Erklärungsansatz für diese Adaptation liegt in einer veränderten Membranlipid-Zusammensetzung bei adaptierten Stämmen (Brown et al. 1997, Chang und Cronan 1999, Yuk und Marshall 2004, Yuk und Marshall 2005).

Saure Lebensmittel sind denn auch in der Vergangenheit wiederholt im Zusammenhang mit STEC-assoziierten Erkrankungsfällen und Ausbrüchen, insbesondere solchen durch *E. coli* O157:H7, beschrieben worden (Tabelle 2). Involvierte Lebensmittel umfassten beispielsweise Apfelsaft (Steele et al. 1982, Besser et al. 1993, CDC 1996, CDC 1997, Cody et al. 1999, Tamblyn et al. 1999, Hilborn et al. 2000), Joghurt (Morgan et al. 1993) oder fermentierte Rohwürste wie Salami (CDC 1995, Paton et al. 1996; Tilden et al. 1996, Ammon et al. 1999, Williams et al. 2000, MacDonald et al. 2004, Sartz et al. 2008, Schimmer et al. 2008, Ethelberg et al. 2009).

Tabelle 2: Auswahl von STEC O157:H7-Ausbrüchen in Assoziation mit sauren Lebensmitteln

Jahr	Ort	Lebensmittel	Humane Krankheitsfälle	Literatur
1991	USA (Massachusetts)	Unpast. Apfelwein	18	Besser et al. 1993
1996	USA (Kalifornien, Colorado, Washington), Kanada (BC)	Unpast. Apfelsaft	70 (14 HUS, 1 Todesfall)	Cody et al. 1999
1996	USA (Connecticut, New York)	Unpast. Apfelwein	67 (1 Todesfall)	CDC 1996
1996	USA (Connecticut)	Unpast. Apfelwein	14	Hilborn et al. 2000
1997	USA (Kalifornien, Colorado, Washington), Kanada (BC)	Unpast. Apfelsaft	28 (12 HUS)	CDC 1997
1998	Kanada (Ontario)	Salami	39	Williams et al. 2000
1998	Kanada (Ontario)	Unpast. Apfelwein	11	Tamblyn et al. 1999
1999	Kanada (BC)	Salami	143	MacDonald et al. 2004

3.3.2 Untersuchungen zur Säureresistenz von STEC in sauren Lebensmitteln

Im Folgenden sind die Ergebnisse von ausgewählten Untersuchungen zum Wachstums- und Reduktionsverhalten von STEC, insbesondere *E. coli* O157:H7, in sauren Lebensmitteln zusammengefasst. Als saure, respektive gesäuerte Lebensmittel gelten gemäss "U.S. Code of Federal Regulations (21 CFR part 114)" Lebensmittel mit einem pH-Wert von <4.6.

3.3.2.1 Fruchtsäfte

In Apfelsaft wuchsen *E. coli* O157:H7 gemäss Koodie und Dhople (2001) bis zu einem pH-Wert von 2.0, während dies für *E. coli*-Kontrollstämme lediglich bis zu einem pH-Wert von 4.0 der Fall war. In einer Studie, die mit einer hohen Ausgangskeimzahl arbeitete, überlebte *E. coli* O157:H7 in Apfelsaft (pH 3.6-4.0) bei 8°C für 31 Tage (Zhao et al. 1993). Ebenso überlebten *E. coli* O157:H7 in Modell-Apfelsaft (pH 3.5 bis 4.5) während 10 Tagen, während *L. monocytogenes* nach dieser Zeit nicht mehr nachzuweisen waren (Moon et al. 2006a). In einer Studie von Oyarzabal et al. (2003) wurden in Apfel-, Orangen-, Ananas- und Grapefruitsaftkonzentrat sowie Bananenpüree inokulierte *E. coli* O157:H7 selbst nach 12-wöchiger Lagerung bei -23°C noch gefunden. Andererseits wurde durch den Zusatz von Vanillin(säure) das Überleben von *E. coli* O157:H7 in Apfelsaft reduziert, wenn auch die Zugabe grösserer Mengen zu unerwünschten sensorischen Veränderungen führte (Moon et al. 2006a, 2006b).

Zudem wurde der Einfluss der Lagertemperatur auf das Wachstums- und Reduktionsverhalten von *E. coli* O157:H7 in Fruchtsäften untersucht. In Ananassaft (pH 3.8) wurde nach einer Lagerung von fünf Tagen bei Raumtemperatur eine Keimzahlreduktion festgestellt, während eine solche bei einer Lagertemperatur von 4°C nicht vorlag (Mutaku et al. 2005). Andererseits wurde in schwach sauren Säften, wie Papaya- oder Avocadosaft (pH 6.1), Wachstum von *E. coli* O157:H7 beobachtet (Mutaku et al. 2005). Ebenso wurden *E. coli* O157:H7 in Erdbeersaft bei einem pH-Wert von 3.6 während einer Lagerung von drei Tagen bei 4°C nicht inaktiviert, während bei 37°C (pH 3.6) eine Inaktivierung erfolgte (Han und Linton 2004).

In verschiedenen Studien wurde das Wachstums- und Reduktionsverhalten von säureadaptierten *E. coli* O157:H7 in Fruchtsäften untersucht. Beispielsweise überlebten für 4 h in Trypticase Soy Broth (TSB, pH 5.0) adaptierte *E. coli* O157:H7 in Spargelsaft (pH 3.6) länger als unadaptierte Stämme, insbesondere falls die Lagerung bei tiefen Temperaturen erfolgte (Hsin-Yi und Chou 2001). Allerdings liessen sich diese Ergebnisse für fermentierte Milchprodukte (Yakult, pH 3.6; Low-Fat-Joghurt, pH 3.9) nach Lagerung bei 7°C nicht bestätigen (Hsin-Yi und Chou 2001). Interessanterweise konnten Sharma et al. (2005) bei säureadaptierten *E. coli* O157:H7 und Salmonellen, nicht jedoch bei *L. monocytogenes*, in Glucose-supplementiertem Melonensaft eine erhöhte Hitzeresistenz nachweisen.

3.3.2.2 Fermentierte Rohwürste

Glass et al. (1992) zeigten in einem Challenge-Versuch, dass *E. coli* O157:H7 die Fermentationsprozesse (pH 4.5) sowie die Lagerung bei der Rohwurstherstellung überleben können. Im Unterschied zu streichfähigen Produkten wurde bei schnittfesten Rohwürsten durch die gezielte Wahl der Reife- und Lagerparameter eine Reduktion von *E. coli* O157:H7 um eine bis fünf \log_{10} -Stufen festgestellt (Glass et al. 1992, Pozzi et al. 1996, Faith et al. 1998). Dafür ist in solchen Produkten dann aber nicht der pH-Wert (Sharma et al. 2004), sondern der tiefe a_w -Wert verantwortlich (Pozzi et al. 1996).

3.3.2.3 Fermentierte Milchprodukte

Untersuchungen zur Persistenz von *E. coli* O157:H7 in fermentierten Milchprodukten zeigten, dass inokulierte *E. coli* O157:H7 in Joghurt (pH 4.0) für 12 Tage, in Sauerrahm (pH 4.3) für 28 Tage und in Buttermilch (pH 4.1) für 35 Tage überlebten (Dineen et al. 1998). Dabei wurde festgestellt, dass die Persistenz durch die Zusammensetzung der Starterkulturen beeinflusst wird. Zudem überlebten *rpoS*-Deletionsmutanten im Vergleich zu den Wildtypen in den untersuchten Milchprodukten deutlich weniger lang (Dineen et al. 1998). Andererseits ergab der Vergleich von traditionellem Joghurt und "Bifido-Joghurt" nach einer Lagerung von sieben Tagen bei 4°C keine deutlichen Unterschiede in der Keimzahl von *E. coli* O157:H7 (Massa et al. 1997). Bei beiden Produkten lag eine Reduktion um ein bis zwei \log_{10} -Stufen vor.

Einen wesentlichen Einfluss auf das Wachstums- und Reduktionsverhalten von *E. coli* O157:H7 hatten auch das Fermentationsverfahren sowie die Lagerbedingungen. Beispielsweise erwies sich für Joghurt die Kombination von zwei Verfahren (3 h bei 43°C; 21 h bei 30°C) als Methode mit dem grössten Reduktionseffekt, während die traditionelle Fermentation (5 h bei 43°C) den geringsten Effekt zeigte und die Fermentation von Kefir (24 h bei 30°C) diesbezüglich eine Mittelstellung einnahm (Gulmez und Guven 2003). Auch beobachteten Bachrouri et al. (2002), dass *E. coli* O157:H7 in Joghurt bei 4°C besser überlebten als bei 22°C. Im Gegensatz dazu überlebten gemäss Lee und Chen (2004) *E. coli* O157:H7 in Joghurt bei 15°C länger als bei 4°C.

Ogwaro et al. (2002) untersuchten das Wachstums- und Reduktionsverhalten von *E. coli* O157:H7 in traditionellem afrikanischem Joghurt in Abhängigkeit von der Fermentations- (37-43°C, pH 4-4.4 oder 25°C, pH 5.0) und Lagertemperatur (4°C oder 25°C). Mit Ausnahme der Fermentation bei 43°C erreichten inokulierte *E. coli* O157:H7 (10^5 KbE/ml) während des Fermentationsprozesses (24 h) die stationäre Phase (10^8 - 10^9 KbE/ml). Während der Lagerung bei 4°C für fünf Tage sank die Keimzahl um zwei bis drei \log_{10} -Stufen, während nach entsprechender Lagerung bei 25°C keine *E. coli* O157:H7 mehr gefunden wurden.

Tsegaye und Ashenafi (2005) beobachteten ähnlichen Ergebnisse in äthiopischen Milchprodukten (Ergo: Sauermilch; Ayib: Hüttenkäse) und folgerten, dass eine kurzzeitige Lagerung solcher Produkte besser bei Umgebungs- statt bei Kühltemperatur erfolgen sollte. In einer aktuellen Studie wurde zudem die Persistenz *E. coli* O157:H7 in einem traditionellen südafrikanischen Milchprodukt (Amasi) untersucht (Dlamini und Buys 2009). Dabei wurde gezeigt, dass *E. coli* O157:H7 unabhängig von einer allfälligen Säureadaptation in Amasi überleben können.

Zudem wurde in verschiedenen Studien nachgewiesen, dass STEC den Herstellungs- und Reifeprozess von Rohmilchkäse überleben können (Maher et al. 2001, Vernozy-Rozand et al. 2005a/b, Schlessner et al. 2006, Zweifel et al. 2006, Caro und García-Armesto 2007). Beispielsweise überlebten inokulierte *E. coli* O157:H7 in Ziegenkäse über 42 Tage (Vernozy-Rozand et al. 2005a), in Cheddar über 60 Tage (Schlessner et al. 2006) und in geschmiertem Rohmilchkäse sowie in Bio-Rohmilchkäse über 90 Tage (Maher et al. 2001, Zweifel et al. 2006). In einer spanischen Studie wurden in Schafskäse STEC selbst nach 12-monatiger Reifung noch gefunden (Caro und García-Armesto 2007). Für eine allfällige Reduktion von STEC sind in Rohmilchkäse jedoch nicht die pH-Werte sondern andere Einflussfaktoren, wie beispielsweise der sinkende a_w -Wert während der Käsereifung, verantwortlich. Vielmehr könnten die in Rohmilchkäse vorliegenden pH-Werte sogar zu einer Säureadaptation beitragen (Maher et al. 2001).

3.3.2.4 Mayonnaise

In einer Studie, die mit einer hohen Ausgangskeimzahl arbeitete, überlebten *E. coli* O157:H7 in Mayonnaise (pH 3.6-3.9) bei 5°C für fünf bis sieben Wochen (Zhao und Doyle 1994). Hathcox et al. (1995) untersuchten das Verhalten von *E. coli* O157:H7 in Mayonnaise (pH 3.9 bis 4.0) und Kalorien-reduzierter Mayonnaise (pH 4.1) bei verschiedenen Temperaturen. Eine Erhöhung der Lagertemperatur von 5 auf 20°C und von 20 auf 30°C hatte eine deutliche Zunahme der Reduktionsrate zur Folge hatte, wobei sich *E. coli* O157:H7 bei 5°C in normaler Mayonnaise als resistenter als in Kalorien-reduzierter Mayonnaise erwiesen (Hathcox et al. 1995).

Zudem wurde das Wachstum respektive Überleben von *E. coli* O157:H7 in verschiedenen Lebensmitteln nach Zugabe von Mayonnaise untersucht (Abdul-Raouf et al. 1993, Arias et al. 2001). Beispielsweise wurde in Rindfleischsalat mit 40% Mayonnaise (pH 5.4-6.1) nach einer Lagerung von 72 h bei 5°C keine Veränderung der Keimzahl von *E. coli* O157:H7 festgestellt, während bei einem geringeren Anteil an Mayonnaise (16-32%) sowie einer höheren Lagertemperatur (21 und 30°C) nach 10 bis 24 h Wachstum vorlag (Abdul-Raouf et al. 1993). Andererseits sind im Hinblick auf die Persistenz von *E. coli* O157:H7 in solchen "Mischprodukten" die inhomogene Verteilung der Mayonnaise und die resultierenden pH-Unterschiede in den Produkten zu beachten (Abdul-Raouf et al. 1993, Arias et al. 2001).

3.3.3 Molekulare Grundlagen der Säureresistenz

Bisher wurden für STEC vier Säureresistenzsysteme beschrieben: (i) ein säureinduziertes oxidatives System gesteuert über RpoS (RNA-Polymerase-Sigmafaktor respektive Stationärphasen-Sigmafaktor), (ii) ein säureinduziertes Arginin-abhängiges System, (iii) ein Glutamat-abhängiges System und (iv) ein Lysin-abhängiges System (Lin et al. 1995, Guilfoyle und Hirshfield 1996, Hersh et al. 1996, Lin et al. 1996, Castanie-Cornet et al. 1999). Waterman und Small (1996) brachten Unterschiede in der phänotypischen Säureresistenz vor allem mit Mutationen im *rpoS*-Gen in Verbindung. Diese Systeme bleiben auch bei Kühltemperaturen über längere Zeit aktiv (Lin et al. 1996). Ihren stärksten Effekt zeigen die Systeme, insbesondere das oxidative System, bei Bakterien in der stationären Wachstumsphase. Zudem gibt es Hinweise darauf, dass bei *E. coli* O157:H7 in Abhängigkeit von der jeweiligen (sauren) Matrix unterschiedliche Säureresistenzsysteme zum Tragen kommen (Price et al. 2004). Umstritten ist die Frage, welche Bedeutung genau RpoS (σ^S) für die verschiedenen Säureresistenzsysteme hat (Lin et al. 1996, Large et al. 2005, Bhagwat et al. 2006). Lin et al. (1996) zeigten dass RpoS essentiell für das oxidative System ist, während ein Fehlen des *rpoS*-Gens in *E. coli* O157:H7 lediglich eine reduzierte Wirkung des Arginin- und Glutamat-abhängigen Systems nach sich zog. Interessanterweise wiesen *rpoS*-Deletionsmutanten in der Studie von Large et al. (2005) bei selektiver Aktivierung des Arginin-abhängigen Systems sogar bessere Überlebensraten auf als die Wildtypen.

3.3.3.1 Oxidatives System und RpoS

Der genaue Wirkmechanismus des oxidativen Systems ist unbekannt. Das oxidative System ist Glucose-unterdrückt, wird in Luria-Bertani (LB)-Nährlösung in Abhängigkeit vom alternativen Sigma-Transkriptions-Faktor (RpoS) induziert und scheint vor allem bei Säurestress über pH 3.0 wirksam zu sein (Lin et al. 1995, Lin et al. 1996, Castanie-Cornet et al. 1999, Price et al. 2000). RpoS spielt eine zentrale Rolle in der Regulation und Expression vieler Proteine der Stationärphase und der Stressantwort (Lange und Hengge-Aronis 1991, Small et al. 1994, Hengge-Aronis 2002). Die Synthese von RpoS wird durch bisher unbekannte Faktoren reguliert und beim Übergang in die stationäre Wachstumsphase erhöht (Loewen und Hengge-Aronis 1994, Loewen et al. 1998). Als möglicher Regulationsfaktor werden kleine (87 Nukleotide), nicht codierende *dsrA* RNA Sequenzen diskutiert (Lease et al. 2004). Unter ungünstigen Umweltbedingungen, wie Nährstoffmangel, osmotischem Stress oder tiefem pH-Wert, steigen die RpoS-Level signifikant an und über 70 an der Stressantwort beteiligte Gene werden transkribiert (Dodd und Aldsworth 2002, Nystrom 2004, Weber et al. 2005). Die Wirkung des oxidativen Systems ist ausserdem abhängig von cAMP und dem cAMP-Regulator-Protein. Zudem wird dieses System während der Adaptationsphase von *E. coli* durch Glutamat oder Glutamin aktiviert (Castanie-Cornet et al. 1999).

3.3.3.2 Glutamat- und Arginin-abhängiges System

Für das Glutamat- respektive Arginin-abhängige System scheint RpoS nicht zwingend notwendig zu sein (Lin et al. 1996). Jedoch scheint zumindest das Glutamat-abhängige System, welches vor allem bei einem pH-Wert unter 3.0 einen protektiven Effekt aufweist (Hersh et al. 1996), teilweise von RpoS kontrolliert zu werden. Essentielle Komponenten des Glutamat-abhängigen Systems sind durch *gadA* respektive *gadB* codierte Glutamat-Decarboxylase-Isoformen und ein durch *gadC* codierter Glutamat- γ -Aminobuttersäure-Antiporter (Smith et al. 1992, Yoshida et al. 1993, Hersh et al. 1996, Castanie-Cornet et al. 1999, Hovde et al. 1999). Durch das Zusammenwirken von Decarboxylase und Antiporter wird verhindert, dass der pH im Intrazellulärraum bei Säurestress zu sehr sinkt. Beim Arginin-abhängigen System stellt das Produkt des *adiA*-Locus, eine Arginin-Decarboxylase, einen zentralen Faktor dar (Auger et al. 1989, Lin et al. 1995). Ein spezifischer Antiporter für das Arginin-abhängige System ist bis anhin nicht bekannt. Zudem scheinen weitere Faktoren den Wirkmechanismus der Aminosäuren-abhängigen Systeme zu beeinflussen.

3.3.3.3 Weitere potentielle Säureresistenzfaktoren/-mechanismen

Viele Faktoren und Regulationsmechanismen im Zusammenhang mit der Stressantwort sind zurzeit noch unbekannt. Eine Auswahl von weiteren, möglicherweise die Säureresistenz beeinflussenden Faktoren ist im Folgenden kurz aufgeführt.

Diskutiert wird beispielsweise der Einfluss der Membranlipid-Zusammensetzung auf die Säureresistenz (Brown et al. 1997, Yuk und Marshall 2004, Yuk und Marshall 2005). Brown et al. (1997) wiesen dabei nach, dass der Gehalt an Cyclopropan-Fettsäuren in der Zellmembran von *E. coli* unter Säurestress zunahm und positiv mit einer erhöhten Säureresistenz korreliert war. Dass Cyclopropan-Fettsäuren einen wesentlichen Einfluss auf die Säureresistenz haben, wurde auch durch Chang und Cronan (1999) bestätigt. Ebenfalls diskutiert werden in diesem Zusammenhang Unterschiede in der Zusammensetzung der "Outer Membrane Proteins" (OMPs) (Sainz et al. 2005).

Large et al. (2005) zeigten, dass ein hoher Gehalt an Mg^{2+} das Überleben von *E. coli* O157:H7 in saurem Milieu erhöht. Dieser Effekt war dabei beim Glutamat-abhängigen System am deutlichsten ausgeprägt. Mg^{2+} scheint die Zellmembranen durch Interaktion mit Lipopolysacchariden zu stabilisieren (Vaara 1992). Allerdings sind viele Aspekte noch nicht abschliessend geklärt.

Lee und Chen (2004) beobachteten, dass die Produktion des Kapsel-Polysaccharids "Colanic Acid" (CA) in *E. coli* O157:H7 zu einem längerem Überleben unter Säurestress führte. Zu vergleichbaren Ergebnissen gelangten anhand der Untersuchung von Deletionsmutanten auch Mao et al. (2006).

4 Material und Methoden

4.1 Bakterienstämme

Für die im Folgenden aufgeführten Wachstums- und Reduktionsversuche wurden fünf *E. coli*-Stämme aus dem Institut für Lebensmittelsicherheit und -hygiene (ILS) und dem Institut für Veterinärbakteriologie (IVB) der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich verwendet.

Die Serotypen, und Charakteristika der verwendeten Stämme sind in den Tabellen 3 und 4 aufgeführt. Dabei handelte es sich um drei Shigatoxin-bildende *E. coli*-Stämme der Serotypen O157:H7, O159:H⁻ und O26:H11, einen nicht-Shigatoxin-bildenden *E. coli* O157:H45-Stamm sowie einen *E. coli* K12-Kontrollstamm.

Tabelle 3: *E. coli*-Stämme

Stamm	Stamm-Nr.	Quelle
<i>E. coli</i> O157:H7	68 (ILS intern)	ILS
<i>E. coli</i> O157:H45	1070/3 (ILS intern)	ILS
<i>E. coli</i> O159: H ⁻	250/1 (ILS intern)	ILS
<i>E. coli</i> O26:H11	3768/1 (ILS intern)	ILS
<i>E. coli</i> K12		IVB

Tabelle 4: Charakterisierung der verwendeten *E. coli*-Stämme

Stamm	Herkunft (Tierart)	Charakterisierung (positiv für)
STEC O157:H7	Rind	<i>stx</i> ₁ , <i>stx</i> _{2c} , <i>eae</i> , <i>ehxA</i> , PT14
EPEC O157:H45	Rind	<i>eae</i> , <i>bfpA</i> , EAF
STEC O159:H ⁻	Schwein	<i>stx</i> ₁ , <i>stx</i> _{2e} , <i>astA</i> , <i>terF</i>
STEC O26:H11	Schaf	<i>stx</i> ₁ , <i>eae</i> , <i>ehxA</i>

4.2 Säuren und pH-Wert

Für die Durchführung der Wachstums- und Reduktionsversuche wurden Salz-, Essig- und Milchsäure verwendet. Zur Einstellung der pH-Werte wurde Brain Heart Infusion (BHI)-Bouillon mit diesen drei Säuren versetzt. Die pH-Werte wurden jeweils zu Beginn der Versuchsserien in frisch angesetztem BHI-Bouillon, das heisst vor der Inokulation, gemessen.

4.3 Materialübersicht

Das für die Wachstums- und Reduktionsversuche verwendete Material ist in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: *Material*

Blutplatten	Columbia Blood Agar, Difco Laboratories, Detroit, USA; Schafblut defibriniert steril, Oxoid Ltd., Hampshire, UK
PC-Agar	Plate Count Agar, Oxoid CM 325
BHI-Bouillon	Brain Heart Infusion, Oxoid CM 225
NaCl-Pepton steril	8,5 g/l NaCl, Merck 6400 reinst, Fluka 71380 p.A.; 1,0 g/l Pepton, tryptisch verdaut, Merck 7213; demineral. Wasser
Pipetten	357504, 10 in 1/10 ml, Wide Tip (FALCON®); 357506, 1 in 1/100 with Plug (FALCON®)
Einweg-Plastikösen	731170, Greiner Bio-One GmbH

4.4 Wachstumsversuche

Zur Durchführung der Wachstumsversuche wurden die *E. coli*-Stämme jeweils in 50 ml BHI-Bouillon mit durch Säurezusatz (Salz-, Essig-, Milchsäure) eingestellten pH-Werten inokuliert. Hierfür wurde jeweils eine Kolonie ab Blutagar mit einer Plastiköse in einen Erlenmeyer-Kolben mit vorbereiteter BHI-Bouillon verbracht und anschliessend durch Schwenken gemischt.

Als schwierig erwies sich das genaue Einstellen der Grösse der Startpopulation. Mit dem beschriebenen Verfahren ergab sich über alle Versuche eine Streuung von bis zu 10^2 KbE/ml. Anfängliche Versuche mit Messung der Extinktion bei 680 nm erwiesen sich jedoch als zu ungenau. In der Regel ergab sich bei der verwendeten Methode eine Anfangskeimzahl von 10^4 bis 10^5 KbE/ml.

Direkt nach dem Beimpfen der BHI-Bouillon mit dem jeweiligen *E. coli*-Stamm wurde, wie in Abschnitt 4.6 aufgeführt, die erste Keimzählung durchgeführt (t_0). Anschliessend wurden in regelmässigen Zeitabständen Keimzählungen durchgeführt. Auf jeden Fall erfolgten Keimzählungen bei $t_0 + 4, 8$ und 24 h, wobei während den ersten 8 h grundsätzlich stündlich Keimzählungen durchgeführt wurden.

Als Wachstum wurde die Zunahme der Keimzahlen bis zum Erreichen der stationären Phase (10^8 bis 10^9 KbE/ml) bezeichnet. Ein wichtiger Aspekt war es dabei, den minimalen pH-Wert zu ermitteln, bei welchen die *E. coli*-Stämme in BHI-Bouillon mit dem Zusatz von Salz-, Essig- und Milchsäure über 24 h ein Wachstum bis in die stationäre Phase zeigten.

4.5 Reduktionsversuche

4.5.1 *E. coli*-Stämme in der stationären Wachstumsphase

Um die stationäre Wachstumsphase zu erreichen, wurden 10 ml BHI-Bouillon (pH 7.0) mit einer Kolonie jedes *E. coli*-Stamms beimpft und über Nacht im Schüttler bei 37°C und 120 bis 220 U/min inkubiert. Anschliessend wurde der pH-Wert der jeweiligen Proben mittels Zugabe von BHI-Bouillon mit Säurezusatz (Salz-, Essig-, Milchsäure) gesenkt. Ein wichtiger Aspekt war es dabei, den pH jeweils soweit zu senken, dass über 24 h knapp keine Reduktion der Keimzahl stattfand.

Direkt nach der pH-Senkung wurde, wie in Abschnitt 4.6 aufgeführt, die erste Keimzählung durchgeführt (t_0). Zum Zeitpunkt t_0 des Versuchs lag die Keimzahl zwischen 10^8 und 10^9 KbE/ml. Anschliessend wurde in regelmässigen Zeitabständen Keimzählungen durchgeführt. Auf jeden Fall erfolgten Keimzählungen bei $t_0 + 4, 8$ und 24 h, wobei während den ersten 8 h grundsätzlich stündlich Keimzählungen durchgeführt wurden.

4.5.2 *E. coli*-Stämme in der logarithmischen Wachstumsphase

Um die logarithmische Wachstumsphase zu erreichen, wurden 10 ml BHI-Bouillon (pH 7.0) mit einer Kolonie jedes *E. coli*-Stamms beimpft und für 4 h im Schüttler bei 37°C und 120 bis 220 U/min inkubiert. Anschliessend wurde der pH-Wert der jeweiligen Proben mittels Zugabe von BHI-Bouillon mit Säurezusatz (Salz-, Essig-, Milchsäure) gesenkt.

Direkt nach der pH-Senkung wurde, wie in Abschnitt 4.6 aufgeführt, die erste Keimzählung durchgeführt (t_0). Zum Zeitpunkt t_0 des Versuchs lag die Keimzahl gemäss Messung im Refraktometer bei circa 10^7 KbE/ml. Anschliessend wurde in regelmässigen Zeitabständen Keimzählungen durchgeführt. Auf jeden Fall erfolgten Keimzählungen bei $t_0 + 2, 4, 8$ und 24 h, wobei während den ersten 8 h grundsätzlich stündlich Keimzählungen durchgeführt wurden.

4.5.3 *E. coli*-Stämme in der stationären Wachstumsphase nach Adaptation an Säurestress

Diese Versuche wurden mit *E. coli* O157:H7, O159:H⁻ und *E. coli* K12 als Referenzstamm durchgeführt. Als Adaptation wurde das vorangehende Verbringen von Teststämmen der Stationärphase in BHI-Bouillon mit pH 5 für 2 h bei 37°C bezeichnet. Diese Säureadaptation wurde jeweils mit derjenigen Säure durchgeführt, die anschliessend auch für den Reduktionsversuch verwendet wurde. Zur Veranschaulichung ist das detaillierte Vorgehen in Abbildung 1 aufgeführt.

Um die stationäre Wachstumsphase zu erreichen, wurden 10 ml BHI-Bouillon (pH 7.0) mit einer Kolonie jedes *E. coli*-Stamms beimpft und über Nacht im Schüttler bei 37°C und 120 bis 220 U/min inkubiert. Anschliessend wurde 1 ml für 2 h einem milden Säurestress (pH 5) ausgesetzt. Hierfür wurde BHI-Bouillon mit Salz-, Essig- und Milchsäurezusatz verwendet. Anschliessend wurde 1 ml der Proben einem Maximalsäurestress ausgesetzt, der um 0.5 pH-Einheiten unter dem in den vorherigen Reduktionsversuchen (Abschnitt 4.2.3.1) ermittelten pH-Bereich lag, bei welchem knapp keine Reduktion der Teststämme in der stationären Wachstumsphase stattgefunden hatte. Ein wichtiger Aspekt war es dabei, den pH jeweils so tief zu wählen, dass zwischen 1 und 2 h ab t_0 eine komplette Inaktivierung stattfand. Die Einstellung des jeweiligen, exakten pH-Werts im Versuch erwies sich dabei als schwierig. Direkt nach der pH-Senkung wurde, wie in Abschnitt 4.6 aufgeführt, die erste Keimzählung durchgeführt (t_0). Anschliessend erfolgten Keimzählungen bei $t_0 + 0.5$, 1, 2 und 4 h.

Um festzustellen, ob tatsächlich eine Adaptation stattgefunden und diese eine verstärkte Säuretoleranz bewirkt hatte, wurden zusätzlich zu Vergleichszwecken Proben der stationären Wachstumsphase ohne vorgängige Adaptation direkt dem gleichen Maximalsäurestress ausgesetzt.

4.6 Keimzahlbestimmung

Zur Keimzahlbestimmung wurden dezimale Verdünnungsreihen hergestellt und jeweils 0.1 ml mittels Spatel-Verfahren auf das Nährmedium aufgebracht. Sämtliche Keimzählungen fanden im Doppelansatz statt. Zur Veranschaulichung ist das detaillierte Vorgehen in Abbildung 2 aufgeführt.

Mit einer sterilen 1 ml-Pipette wurden 0.1 ml der jeweiligen Verdünnungsstufe in Petrischalen mit PC-Agar pipettiert und anschliessend 1.0 ml derselben Verdünnungsstufe in ein weiteres Kulturröhrchen mit 9 ml 0.85% NaCl-Pepton-Lösung gegeben. Dieses Vorgehen wurde bis zur gewünschten Verdünnungsstufe wiederholt. Nachdem 0.1 ml der entsprechenden Verdünnungsstufe in Petrischalen mit PC-Agar pipettiert worden waren, wurde die Flüssigkeit mit einem sterilen Spatel kreisförmig verteilt. Anschliessend wurden die Medien bei 37°C für 24 h unter aeroben Bedingungen inkubiert. Waren die Kolonien nach der Inkubation zu klein (<0.5 mm) für die Koloniezählung (Reduktionsversuche), wurde für weitere 12 h inkubiert. Dieses Vorgehen ergab stets gut zählbare Kolonien.

Nach der Inkubation wurden die Nährmedien-Platten manuell ausgezählt. Berechnet wurde die Keimzahl anhand der Verdünnungsstufen, welche zwischen 70 und 700 KbE aufwiesen. Die effektive Keimzahl (KbE/ml) ergab sich durch Multiplikation der ausgezählten KbE/Platte mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor.

5 Ergebnisse & Diskussion

5.1 Allgemeines

In der Literatur wurden keine Studien gefunden, welche vergleichend das Wachstums- und Reduktionsverhalten von STEC bei verschiedenen pH-Werten (Salzsäure, Essigsäure, Milchsäure) ausserhalb eines Lebensmittels untersuchten. In der vorliegenden Arbeit wurde daher das Verhalten von fünf *E. coli*-Stämmen, drei Shigatoxin-bildenden Stämmen der Serotypen O157:H7, O159:H⁻ und O26:H11, einem nicht-Shigatoxin-bildenden *E. coli* O157:H45-Stamm sowie einem *E. coli* K12-Kontrollstamm, bei unterschiedlichen pH-Werten untersucht. Zur Einstellung der pH-Werte wurde BHI-Bouillon mit Salzsäure, Essigsäure oder Milchsäure versetzt. Salzsäure wurde in Anlehnung an die Bedingungen im Magen respektive während der Magenpassage gewählt, während die anderen beiden Säuren häufig in der Lebensmittelindustrie eingesetzt werden.

In den Abbildungen 3 bis 11 sind die detaillierten Ergebnisse der mit *E. coli* O26:H11, *E. coli* O157:H7, *E. coli* O157:H45, *E. coli* O159:H⁻ und *E. coli* K12 durchgeführten Wachstums- und Reduktionsversuche ersichtlich. Die Wachstumskurven in BHI-Bouillon mit Salzsäure- (pH 7.4, 6.0, 5.5, 5.0, 4.5, 4.0), Essigsäure- (pH 7.4, 6.1, 5.5, 5.0) und Milchsäure-Zusatz (pH 7.4, 5.5, 5.0) sind in den Abbildungen 3, 5 und 7 aufgeführt. Die Abbildungen 4, 6 und 8 zeigen die Ergebnisse der Reduktionsversuche in BHI-Bouillon mit Salzsäure- (pH 5.1, 4.0, 3.8, 3.7, 3.5, 3.3), Essigsäure- (pH 5.0, 4.4, 4.1, 4.0, 3.8) respektive Milchsäure-Zusatz (pH 4.1, 3.8). Der Vergleich des Reduktionsverhaltens von adaptierten und nicht adaptierten *E. coli* O157:H7, *E. coli* O159:H⁻ und *E. coli* K12 in der stationären Wachstumsphase sind in den Abbildungen 9, 10 und 11 aufgeführt. Zudem zeigt die Abbildung 12 die beobachteten Unterschiede in der Koloniegrösse von *E. coli* O157:H7 und *E. coli* K12 auf PC-Agar (20 h, 37°C) nach den Reduktionsversuchen in BHI-Bouillon pH 3.5 (Essigsäure).

5.2 Wachstumsversuche

Als Wachstum wurde die Zunahme der Keimzahlen bis zum Erreichen der stationären Wachstumsphase (10^8 bis 10^9 KbE/ml) bezeichnet. In Tabelle 6 sind die minimalen pH-Werte aufgeführt, bei welchen *E. coli* O26:H11, *E. coli* O157:H7, *E. coli* O157:H45, *E. coli* O159:H⁻ und *E. coli* K12, in Abhängigkeit vom Säurezusatz über 24 h ein Wachstum bis in die stationäre Phase zeigten. Die detaillierten Wachstumskurven der *E. coli*-Stämme in BHI-Bouillon mit Salzsäure- (pH 7.4, 6.0, 5.5, 5.0, 4.5, 4.0), Essigsäure- (pH 7.4, 6.1, 5.5, 5.0) und Milchsäure-Zusatz (pH 7.4, 5.5, 5.0) sind in den Abbildungen 3, 5 und 7 aufgeführt.

Tabelle 6: Minimale pH-Werte, bei welchen über 24 h die stationäre Wachstumsphase erreicht wurde

Stamm	Minimale pH-Werte für stationäre Phase nach 24 h		
	Salzsäure	Essigsäure	Milchsäure
<i>E. coli</i> O157:H7	4.5	6.1	5.5
<i>E. coli</i> O157:H45	4.5	5.5	5.5
<i>E. coli</i> O159:H ⁻	5.0	6.1	5.5
<i>E. coli</i> O26:H11	5.0	6.1	5.5
<i>E. coli</i> K12	5.0	6.1	5.5

Beim Vergleich der *E. coli*-Stämme zeigten sich in den Wachstumsversuchen betreffend minimalem pH-Wert bei *E. coli* O26:H11, *E. coli* O159:H⁻ und *E. coli* K12 keine Unterschiede (Tabelle 6; Abbildungen 3, 5, 7). Andererseits wuchsen der Shigatoxin-bildende *E. coli* O157:H7-Stamm und der nicht-Shigatoxin-bildende *E. coli* O157:H45-Stamm auch noch in BHI-Bouillon pH 4.5 (Salzsäure) (Abbildung 3E). Damit lag der minimale pH-Wert für das Wachstum von *E. coli* O157:H7 und *E. coli* O157:H45 um 0.5 pH-Stufen tiefer als für die anderen Stämme. Zudem zeigte *E. coli* O157:H45 auch in BHI-Bouillon pH 5.5 (Essigsäure) Wachstum, während dies für die anderen Stämme nur bis zu einem pH-Wert von 6.1 zutraf (Abbildung 5B/C).

Beim Vergleich der Säuren (Salzsäure, Essigsäure, Milchsäure) hemmte der Zusatz von Essigsäure das Wachstum am effektivsten (Tabelle 6; Abbildungen 3, 5, 7). Mit Ausnahme von *E. coli* O157:H45 zeigten alle Stämme in BHI-Bouillon mit Essigsäure-Zusatz bei einem pH-Wert von weniger als 6.1 kein Wachstum mehr (Abbildung 5C). Demgegenüber wuchsen *E. coli* O26:H11, *E. coli* O159:H⁻ und *E. coli* K12 in BHI-Bouillon mit Salzsäure-Zusatz bis zu einem pH-Wert von 5.0 und *E. coli* O157:H7 und O157:H45 gar bis zu einem solchen von 4.5 (Abbildung 3D/E). Beim Zusatz von Milchsäure lagen die Ergebnisse zwischen denjenigen von Essig- und Salzsäure und es zeigten sich keine Unterschiede zwischen den *E. coli*-Stämmen (Tabelle 6). So erfolgte in BHI-Bouillon (Milchsäure) mit einem pH-Wert von 5.5 über 24 h noch knapp ein Wachstum, während bei einem pH-Wert von 5.0 bereits eine Reduktion festgestellt wurde (Abbildung 7B/C).

Im Rahmen der durchgeführten Wachstumsversuche zeigten sich in Abhängigkeit von Stamm und Säurezusatz Unterschiede im Wachstumsverhalten. Im Vergleich der fünf *E. coli*-Stämme erwies sich insgesamt der nicht-Shigatoxin-bildende *E. coli* O157:H45-Stamm als derjenige mit der höchsten Säuretoleranz. Ebenfalls eine leicht erhöhte Säuretoleranz, zumindest bei Salzsäure-Zusatz, zeigte sich beim Shigatoxin-bildenden *E. coli* O157:H7-Stamm, während bei den übrigen Stämmen (*E. coli* O26:H11, *E. coli* O159:H⁻, *E. coli* K12) keine Unterschiede festgestellt wurden. Im Vergleich der drei Säuren hemmte der Zusatz von Essigsäure das Wachstum am effektivsten, gefolgt von Milch- und Salzsäure.

5.3 Reduktionsversuche

Es ist bereits für einige *Enterobacteriaceae* bekannt, dass durch den Einfluss eines tiefen pH-Werts eines Milieus eine zusätzliche Säuretoleranz induziert werden kann (Goodson und Rowbury 1989, Tsai und Ingham 1997, Jordan et al. 1999, Stopforth et al. 2007). Die Säureresistenz wird dabei wesentlich durch die Temperatur und andere in- und extrinsische Faktoren beeinflusst (Small et al. 1994, Clavero und Beuchat 1996, Cheng und Kaspar 1998, Kreske et al. 2008, Oh et al. 2009). Zudem führt eine induzierte Säureresistenz möglicherweise zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Hitze, Salz oder Bestrahlung (Buchanan et al. 1999, Cheville et al. 1996, Garren et al. 1998, Ryu und Beuchat 1998, Chung et al. 2006). Bekannt ist auch das unterschiedliche Reduktionsverhalten von Zellen der stationären und der logarithmischen Wachstumsphase unter Säurestress, wobei letztere in der Regel deutlich schneller inaktiviert werden (Arnold und Kaspar 1995, Benjamin und Datta 1996, Chang und Cronan 1999, Dodd und Aldsworth 2002, Gawande und Bhagwat 2002, de Jonge et al. 2003, Koutsoumanis und Sofos 2004). So war in der Studie von de Jonge et al. (2003) nach extremem Säurestress (pH 2.5) die anfängliche Keimzahl von adaptierten *E. coli* O157:H7 der stationären Wachstumsphase nach 2 h erhalten, während die Keimzahl von *E. coli* O157:H7 der logarithmischen Wachstumsphase bereits nach 30 min unter der Nachweisgrenze lag.

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen wurde die Inaktivierung respektive Persistenz von *E. coli* O26:H11, *E. coli* O157:H7, *E. coli* O157:H45, *E. coli* O159:H⁻ und *E. coli* K12 der stationären und der logarithmischen Wachstumsphase untersucht. Hierfür wurden das Reduktionsverhalten der Stämme in BHI-Bouillon mit Salzsäure- (pH 5.1, 4.0, 3.8, 3.7, 3.5, 3.3), Essigsäure- (pH 5.0, 4.4, 4.1, 4.0, 3.8) und Milchsäure-Zusatz (pH 4.1, 3.8) betrachtet (Abbildungen 4, 6, 8). Zudem wurde die Reduktion von adaptierten und nicht adaptierten *E. coli* O157:H7, *E. coli* O159:H⁻ und *E. coli* K12 der stationären Wachstumsphase verglichen (Abbildungen 9, 10, 11).

5.3.1 Vergleich des Reduktionsverhaltens der Teststämme in der stationären und logarithmischen Wachstumsphase

Für den Vergleich des Reduktionsverhaltens der Teststämme in der stationären oder logarithmischen Wachstumsphase wurde zunächst der pH-Wert bestimmt, bei welchem über 24 h knapp keine Reduktion von Stämmen in der Stationärphase (10^8 bis 10^9 KbE/ml) erfolgte. Ausgehend hiervon wurde anschliessend der Unterschied im Keimzahlverlauf zwischen Stämmen der stationären und logarithmischen Wachstumsphase bestimmt (Abbildungen 4, 6, 8). In der Regel sank dabei die Keimzahl der *E. coli*-Stämme in der logarithmischen Wachstumsphase innerhalb von 8 h unter die Nachweisgrenze (10^1 KbE/ml). In Tabelle 7 sind diejenigen pH-Werte aufgeführt, bei welchen in den Reduktionsversuchen der grösste Unterschied im Keimzahlverlauf zwischen Stämmen der stationären und der logarithmischen Wachstumsphase vorlag.

Tabelle 7: pH-Werte, bei welchen in den Reduktionsversuchen die grösste Keimzahldifferenz zwischen Stämmen der stationären (Stat) und logarithmischen (Log) Wachstumsphase vorlag

Stamm	pH-Wert mit grösster Keimzahldifferenz zw. Stat- und Log-Phase		
	Salzsäure	Essigsäure	Milchsäure
<i>E. coli</i> O157:H7	3.3	4.1	3.8
<i>E. coli</i> O157:H45	3.3	4.1	3.8
<i>E. coli</i> O159:H ⁻	3.5	4.4	4.1
<i>E. coli</i> O26:H11	3.5	3.8	3.8
<i>E. coli</i> K12	3.5	4.1	3.8

Beim Vergleich der *E. coli*-Stämme ergaben sich im Hinblick auf den pH-Wert mit der grössten Keimzahldifferenz zwischen stationärer und logarithmischer Wachstumsphase, in Abhängigkeit vom jeweiligen Säurezusatz, Unterschiede von 0.2 bis 0.6 pH-Stufen (Tabelle 7). Im Vergleich der Säureresistenz der fünf *E. coli*-Stämme waren die Unterschiede betreffend Reduktionsverhalten weniger ausgeprägt als in den Wachstumsversuchen. Während sich der Shigatoxin-bildende *E. coli* O157:H7-Stamm und der nicht-Shigatoxin-bildende *E. coli* O157:H45-Stamm in BHI-Bouillon mit Salzsäure-Zusatz als resistenter (pH 3.3) als die übrigen Stämme (pH 3.5) erwiesen (Abbildung 4), traf dies in BHI-Bouillon mit Essigsäure-Zusatz für den Shigatoxin-bildenden *E. coli* O26:H11-Stamm zu (pH 3.8) (Abbildung 6). So fand unter diesen Bedingungen die erste deutliche Reduktion von *E. coli* O26:H11 erst nach über 8 h statt (Abbildung 6E), während beispielsweise *E. coli* O157:H7 und *E. coli* O157:H45 bereits nach 2 h nicht mehr nachzuweisen waren. Grundsätzlich zeigten dabei *E. coli* O26:H11 wenig Unterschiede im Reduktionsverhalten von Keimen der stationären und der logarithmischen Phase (Abbildung 6D/E). Andererseits erwies sich der Shigatoxin-bildende *E. coli* O159:H⁻-Stamm in BHI-Bouillon mit Essigsäure- oder Milchsäure-Zusatz als empfindlicher (pH 4.4 respektive 4.1) als die übrigen Stämme (pH 3.8 bis 4.1 respektive 3.8) (Abbildungen 6 und 8).

Interessanterweise war bei Maximalsäurestress (pH 2.5 bis 3.5) eine Reduktion des Durchmessers der Kolonien zu beobachten. Am deutlichsten ausgeprägt war dieses Phänomen bei *E. coli* K12, gefolgt von (in abnehmender Reihenfolge) *E. coli* O159:H⁻, *E. coli* O26:H11 und *E. coli* O157:H7/H45. Dieser Unterschied in der Koloniegrösse ist in Abbildung 12 beispielhaft für *E. coli* O157:H7 und *E. coli* K12 dargestellt. In diesem Fall waren die auf PC-Agar gewachsenen *E. coli* O157:H7-Kolonien nach den Reduktionsversuchen in BHI-Bouillon pH 3.5 (Essigsäure) mehr als doppelt so gross wie diejenigen von *E. coli* K12.

Beim Vergleich der Säuren (Salzsäure, Essigsäure, Milchsäure) erwies sich der Zusatz von Essigsäure als am effektivsten im Hinblick auf eine Keimzahlreduktion, gefolgt von Milchsäure und Salzsäure (Tabelle 7; Abbildungen 4, 6, 8). Interessanterweise erwies sich Essigsäure auch in weiteren Studien als der effektivste Zusatz betreffend Wachstumshemmung und Inaktivierung von *E. coli* O157:H7 (Deng et al. 1999, Ryu et al. 1999). Ähnliche Ergebnisse ergab auch die von Abdul-Raouf et al. (1993) in einem Lebensmittel (Rindshackfleisch) durchgeführte Studie. Im Rahmen unserer Reduktionsversuche war die bakterizide Wirkung der drei Säuren bei Teststämmen in der logarithmischen Wachstumsphase ausgeprägter als bei denjenigen in der stationären Phase. Insbesondere beim Zusatz von Salzsäure war dieser Unterschied deutlich ausgeprägt (Abbildung 4). So zeigte sich bei allen *E. coli*-Stämmen in der stationären Wachstumsphase bei den in Tabelle 7 aufgeführten pH-Werten über 8 h kaum eine Reduktion, während diejenigen in der logarithmischen Phase nach maximal 6 h nicht mehr nachzuweisen waren. Beim Zusatz von Essigsäure waren die Unterschiede weniger deutlich ausgeprägt (Abbildung 6). Mit Ausnahme von *E. coli* O159:H⁻ waren bei den in Tabelle 7 aufgeführten pH-Werten nach 24 h keine Bakterien der stationären Wachstumsphase mehr nachzuweisen (Abbildung 6B/C/E). Auffällig war andererseits auch die deutliche Differenz zwischen den Reduktionskurven von *E. coli* O159:H⁻ (Abbildung 6B).

Im Rahmen der durchgeführten Reduktionsversuche zeigten sich in Abhängigkeit von Stamm und Säurezusatz deutliche Unterschiede zwischen Stämmen in der stationären und der logarithmischen Wachstumsphase. Beim Vergleich von *E. coli* O26:H11, *E. coli* O157:H7, *E. coli* O157:H45, *E. coli* O159:H⁻ und *E. coli* K12 konnte bei keinem - Shigatoxin-bildenden oder nicht-Shigatoxin-bildenden - *E. coli*-Stamm eine deutlich erhöhte Säureresistenz festgestellt werden. Auffällig war jedoch der Unterschied in der Koloniegröße nach Säurestress in einem pH-Bereich von 2.5 bis 3.5, wobei diejenige von *E. coli* O157:H7/H45 am wenigsten beeinflusst wurde. Im Vergleich der drei Säuren erwies sich der Zusatz von Essigsäure als am effektivsten im Hinblick auf eine Keimzahlreduktion, gefolgt von Milchsäure und Salzsäure.

5.3.2 Vergleich des Reduktionsverhaltens von säureadaptierten und nicht adaptierten Teststämmen in der stationären Wachstumsphase

Bei diesen Untersuchungen wurden das Reduktionsverhalten von vorgängig säureadaptierten (pH 5.0, 2 h, 37°C) und nicht adaptierten *E. coli* O157:H7, *E. coli* O159:H⁻ und *E. coli* K12 der stationären Wachstumsphase bei Maximalsäurestress (BHI-Bouillon mit Zusatz von: Salzsäure, pH 2.1; Essigsäure, pH 3.5; Milchsäure, pH 3.1) verglichen. Der pH-Wert wurde dabei jeweils so tief gewählt, dass es nach 2 h zu einer kompletten Inaktivierung der Teststämmen kam. Beim Vergleich der Ergebnisse zeigten sich Unterschiede zwischen den Säuren und teilweise auch den *E. coli*-Stämmen.

In BHI-Bouillon mit Salzsäure-Zusatz (pH 2.1) liess sich bei *E. coli* O157:H7, *E. coli* O159:H⁻ und *E. coli* K12 nach Adaptation eine erhöhte Säureresistenz nachweisen (Abbildung 9). Wenn sich dieser Effekt auch bei zwei (*E. coli* O159:H⁻, *E. coli* K12) der drei Stämme nicht im "Endresultat" (Zeitpunkt der Inaktivierung) manifestierte, zeigte sich der Einfluss der Adaptation dennoch deutlich im Verlauf der Reduktionskurven (Abbildung 9). So lagen die Keimzahlen der nicht adaptierten *E. coli*-Stämme bei den Zwischenmesspunkten ($t_0 + 0.5$ und 1 h) um 0.5 bis 3.5 log₁₀-Stufen unter denjenigen der adaptierten Stämme. Bei *E. coli* O157:H7 überlebten die adaptierten Bakterien zudem 1 h länger als die nicht adaptierten (Abbildung 9A), während dies bei *E. coli* O159:H⁻ und *E. coli* K12 nicht zu beobachten war (Abbildung 9B/C).

In BHI-Bouillon mit Essigsäure-Zusatz (pH 3.5) liess sich bei *E. coli* O159:H⁻ und *E. coli* K12 nach Adaptation eine erhöhte Säureresistenz nachweisen (Abbildung 10B/C), während dies bei *E. coli* O157:H7 nicht der Fall war (Abbildung 10A). Bei *E. coli* O159:H⁻ und *E. coli* K12 überlebten die adaptierten Bakterien zudem 0.5 h länger als die nicht adaptierten (Abbildung 10B/C), während bei *E. coli* O157:H7 bereits nach 0.5 h keine Bakterien mehr nachweisbar waren (Abbildung 10A). Interessanterweise zeigten Ryu und Beuchat (1998), dass zwischen säureadaptierten *E. coli* O157:H7 (Buchanan und Edelson 1996), säuregeschockten *E. coli* O157:H7 und einem *E. coli* O157:H7-Kontrollstamm in TSB pH 3.4 oder 3.9 (Essigsäure) keine deutlichen Unterschiede in der Säuretoleranz vorlagen.

Im Gegensatz dazu liess sich in BHI-Bouillon mit Milchsäure-Zusatz (pH 3.1) bei den drei *E. coli*-Stämmen nach Adaptation keine erhöhte Säureresistenz nachweisen (Abbildung 11). Nicht adaptierte *E. coli* O157:H7 und *E. coli* K12 überlebten sogar länger als die adaptierten Teststämme (Abbildung 11A und 11C), während bei *E. coli* O159:H⁻ kein Unterschied festgestellt werden konnte (Abbildung 11B). Anders als bei unseren Ergebnissen waren in der Studie von Ryu und Beuchat (1998) säureadaptierte *E. coli* O157:H7 (Buchanan und Edelson 1996) in TSB pH 3.4 oder 3.9 (Milchsäure) säureresistenter als säuregeschockte *E. coli* O157:H7 oder der *E. coli* O157:H7-Kontrollstamm.

Im Rahmen der durchgeführten Reduktionsversuche von adaptierten und nicht adaptierten Shigatoxin-bildenden *E. coli* O157:H7, Shigatoxin-bildenden *E. coli* O159:H⁻ und *E. coli* K12 zeigten sich in Abhängigkeit vom Säurezusatz deutliche Unterschiede. Während die mit Salzsäure adaptierten *E. coli*-Stämme eine erhöhte Säureresistenz aufwiesen, war dies nach Adaptation an Milchsäure nicht der Fall. Interessanterweise führte die Adaptation mit Essigsäure zu einer erhöhten Säureresistenz bei *E. coli* O159:H⁻ und *E. coli* K12, nicht aber bei *E. coli* O157:H7.

5.4 Schlussfolgerungen

Im Hinblick auf Unterschiede in der Säureresistenz von STEC und anderen *E. coli* existieren in der Literatur divergierende Daten. Untersuchungen von Castanie-Cornet et al. (1999) zeigten diesbezüglich keinen Unterschied zwischen kommensalen *E. coli* und Shigatoxin-bildenden *E. coli* O157. Ebenfalls ist nicht überzeugend geklärt, ob signifikante Unterschiede in der Säureresistenz von STEC verschiedener Serotypen bestehen (Molina et al. 2003, Bhagwat et al. 2005, Large et al. 2005, Oh et al. 2009). Zudem scheint eine beträchtliche Varianz in der Säureresistenz zwischen verschiedenen STEC-Stämmen auch des gleichen Serotyps zu bestehen (Benjamin und Datta 1996, Chang und Cronan 1999, McKellar und Knight 1999, Duffy et al. 2000, Whiting und Golden 2002, Large et al. 2005, Bergholz und Whittam 2007, Oh et al. 2009), was möglicherweise mit dem Vorhandensein respektive der Funktionalität der RpoS-Allele zusammenhängt (Chang und Cronan 1999).

Die Ergebnisse der in der vorliegenden Arbeit unter Säurestress durchgeführten Stammvergleiche lassen sich wie folgt zusammenfassen: (1) Die beiden *E. coli*-Stämme des Serotyps O157 (STEC O157:H7, EPEC O157:H45) erwiesen sich in Bezug auf ihre Wachstumskapazität als am säureresistentesten, wobei zwischen diesen Stämmen Unterschiede in Bezug auf die verwendete Säure (Salzsäure, Essigsäure) bestanden. (2) Wie zu erwarten, zeigten sich deutliche Säureresistenz-Unterschiede zwischen Stämmen in der stationären und logarithmischen Wachstumsphase, wobei sich diejenigen in der logarithmischen Phase als säureempfindlicher erwiesen. (3) Bei der Persistenzfähigkeit der Stämme (stationäre Phase) lagen in Abhängigkeit von der verwendeten Säure deutliche Unterschiede vor. So waren die beiden O157-Stämme (STEC O157:H7, EPEC O157:H45) am resistentesten bei der Verwendung von Salzsäure, während dies für den O26:H11-Stamm bei Essigsäure zutraf. Bei Verwendung von Milchsäure zeigten sich erstaunlicherweise keine Unterschiede zwischen den untersuchten *E. coli*-Stämmen. (4) Eine Säure-Präkonditionierung der Stämme ergab tendenziell eine verbesserte nachfolgende Säureresistenz (Salzsäure, Essigsäure). Dieser Effekt konnte aber für die Säureresistenz in Milchsäure nicht gezeigt werden. (5) Bei der "stress response" von enteropathogenen *E. coli* auf Säurestress scheinen grosse Stammunterschiede zu bestehen, die vor allem von der verwendeten Säure und weniger vom Serotyp oder dem Muster an Virulenzfaktoren der Stämme abhängen.

6 Abbildungen

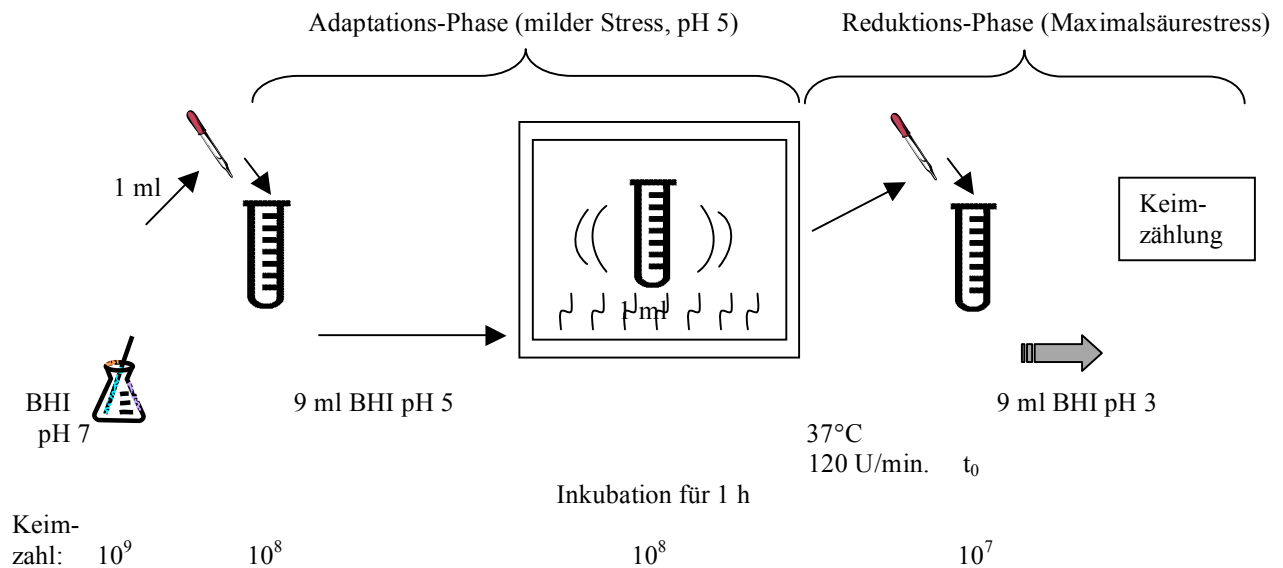


Abbildung 1. Reduktionsversuche in der stationären Wachstumsphase nach Adaptation an Säurestress. Dabei fand jeweils bei t_0 (= Beginn Maximalsäurestress) und $t_0 + 0.5, 1, 2, 4$ h eine Keimzählung statt.

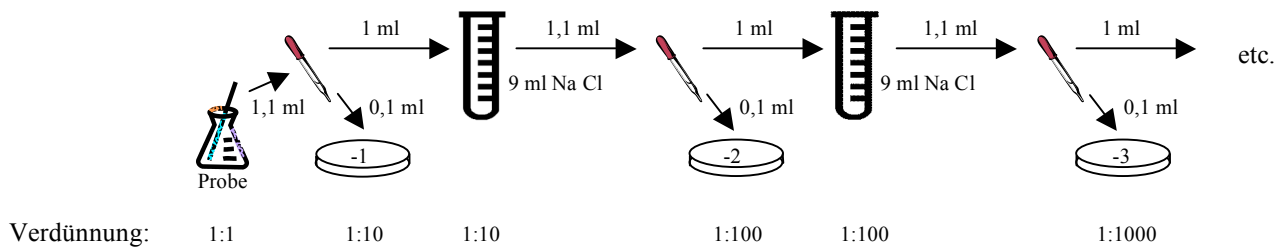


Abbildung 2. Herstellen einer dezimalen Verdünnungsreihe und Beimpfen der Petrischalen mit PC-Agar

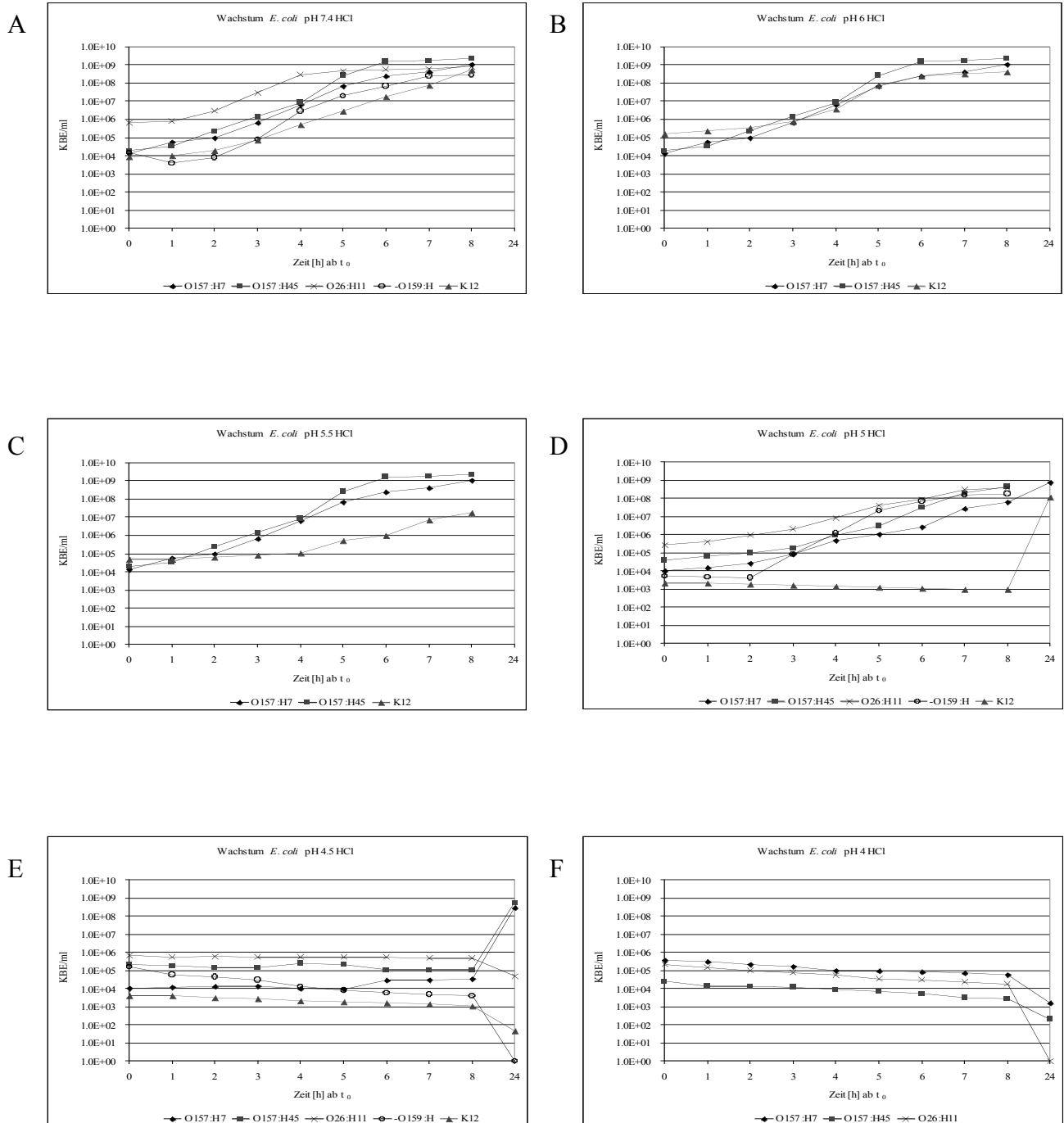


Abbildung 3. Wachstumsverhalten von fünf *E. coli*-Stämmen (*E. coli* O26:H11, *E. coli* O157:H7, *E. coli* O157:H45, *E. coli* O159:H, *E. coli* K12) in BHI-Bouillon mit Salzsäure-Zusatz (pH: A, 7.4; B, 6.0; C, 5.5; D, 5.0; E, 4.5; F:4.0).

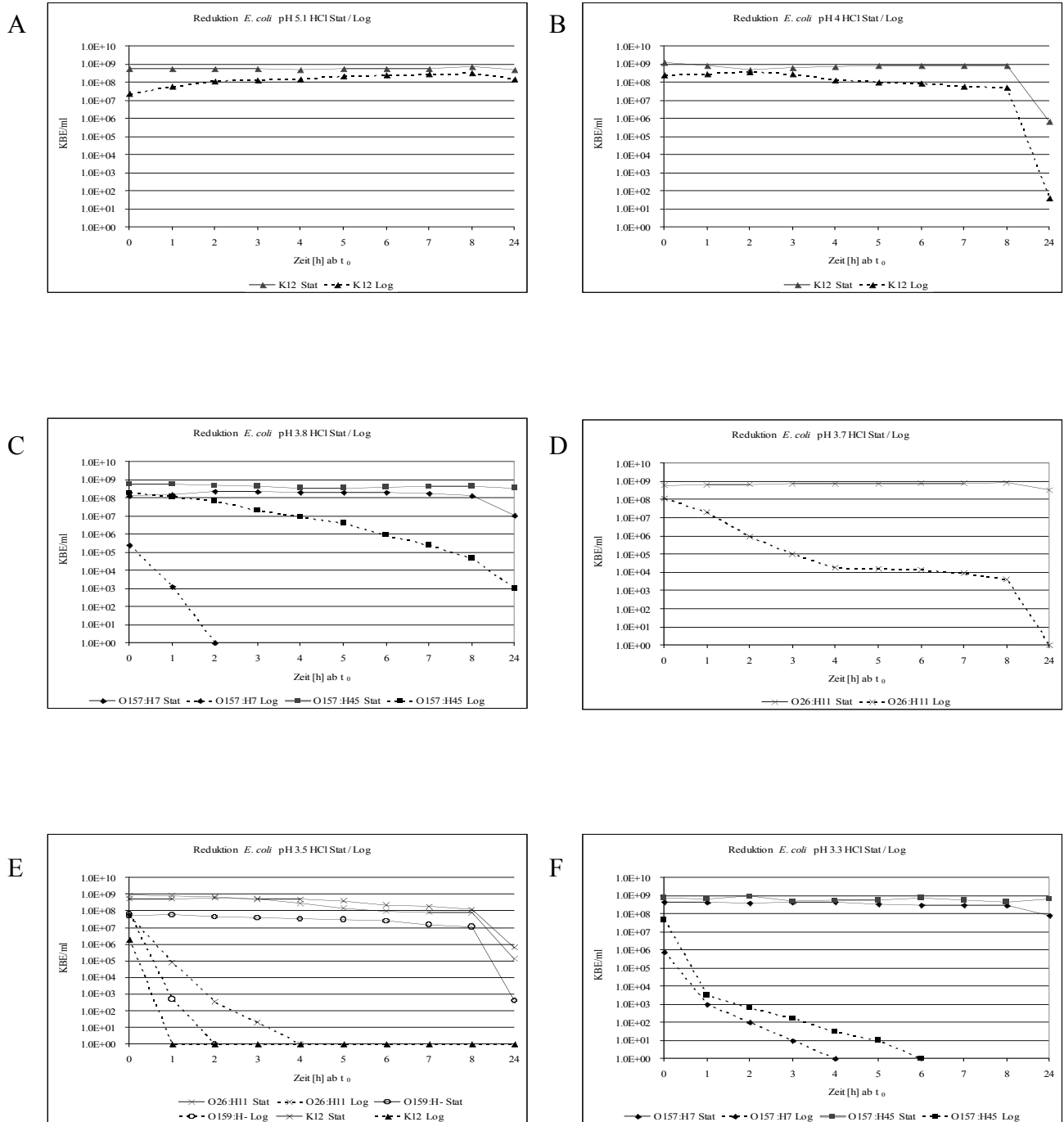


Abbildung 4. Reduktionsverhalten von fünf *E. coli*-Stämmen (*E. coli* O26:H11, *E. coli* O157:H7, *E. coli* O157:H45, *E. coli* O159:H-, *E. coli* K12) der stationären (Stat) und logarithmischen (Log) Wachstumsphase in BHI-Bouillon mit Salzsäure-Zusatz (pH: A, 5.1; B, 4.0; C, 3.8; D, 3.7; E, 3.5; F:3.3).

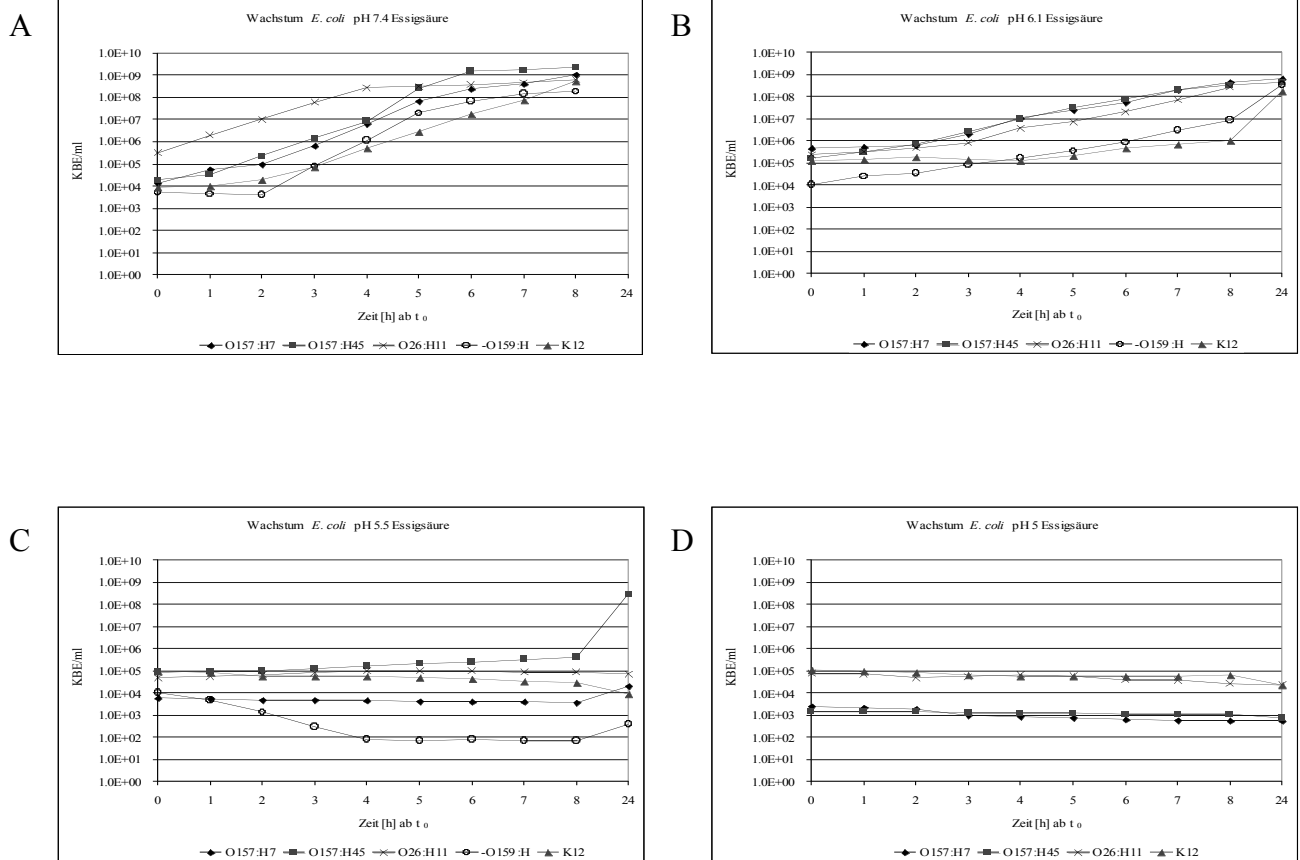


Abbildung 5. Wachstumsverhalten von fünf *E. coli*-Stämmen (*E. coli* O26:H11, *E. coli* O157:H7, *E. coli* O157:H45, *E. coli* O159:H, *E. coli* K12) in BHI-Bouillon mit Essigsäure-Zusatz (pH: A, 7.4; B, 6.1; C, 5.5; D, 5.0).

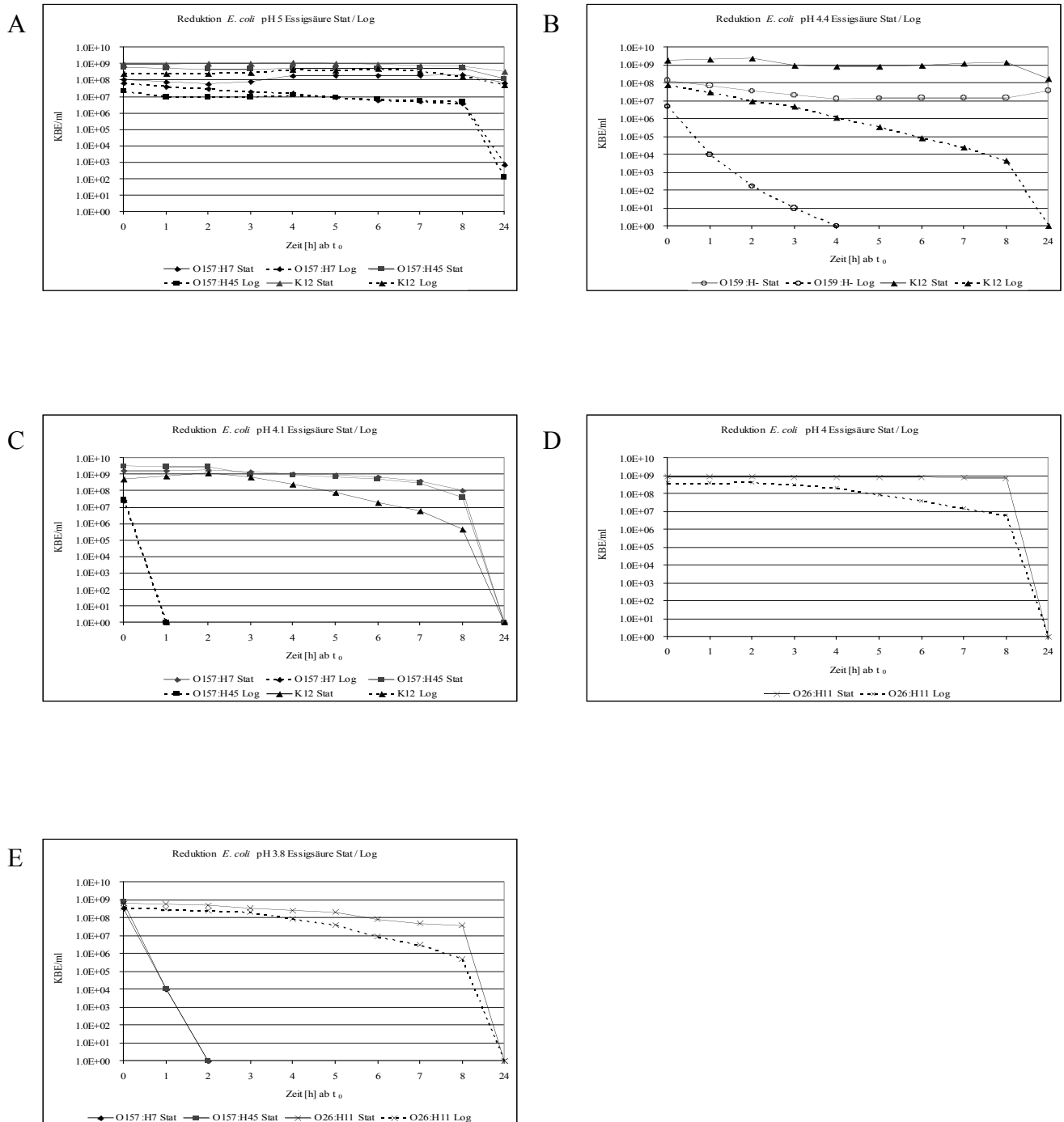
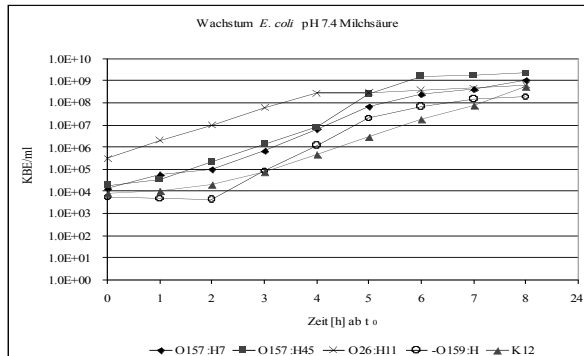
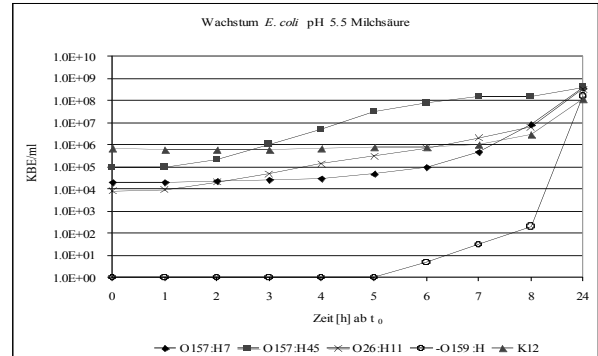


Abbildung 6. Reduktionsverhalten von fünf *E. coli*-Stämmen (*E. coli* O26:H11, *E. coli* O157:H7, *E. coli* O157:H45, *E. coli* O159:H-, *E. coli* K12) der stationären (Stat) und logarithmischen (Log) Wachstumsphase in BHI-Bouillon mit Essigsäure-Zusatz (pH: A, 5.0; B, 4.4; C, 4.1; D, 4.0; E, 3.8).

A



B



C

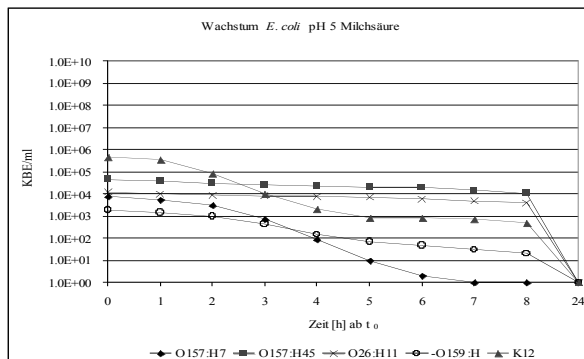


Abbildung 7. Wachstumsverhalten von fünf *E. coli*-Stämmen (*E. coli* O26:H11, *E. coli* O157:H7, *E. coli* O157:H45, *E. coli* O159:H, *E. coli* K12) in BHI-Bouillon mit Milchsäure-Zusatz (pH: A, 7.4; B, 5.5; C, 5.0).

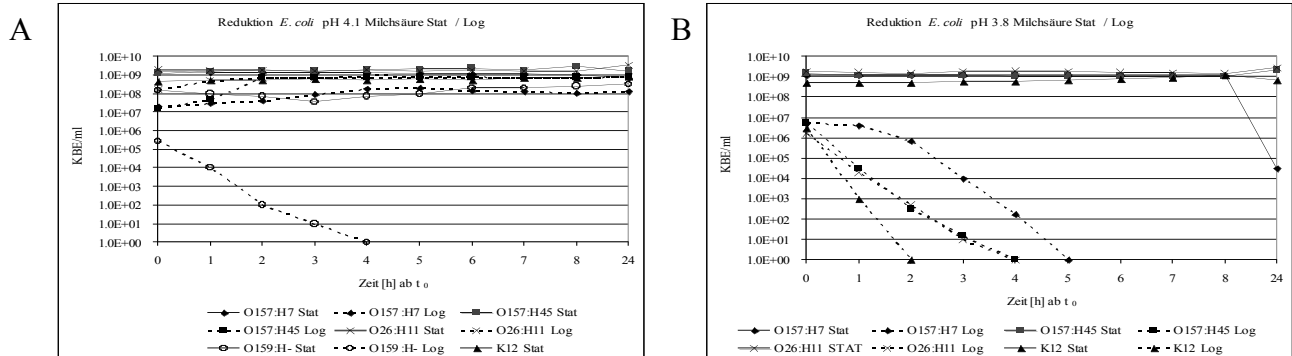


Abbildung 8. Reduktionsverhalten von fünf *E. coli*-Stämmen (*E. coli* O26:H11, *E. coli* O157:H7, *E. coli* O157:H45, *E. coli* O159:H-, *E. coli* K12) der stationären (Stat) und logarithmischen (Log) Wachstumsphase in BHI-Bouillon mit Milchsäure-Zusatz (pH: A, 4.1; B, 3.8).

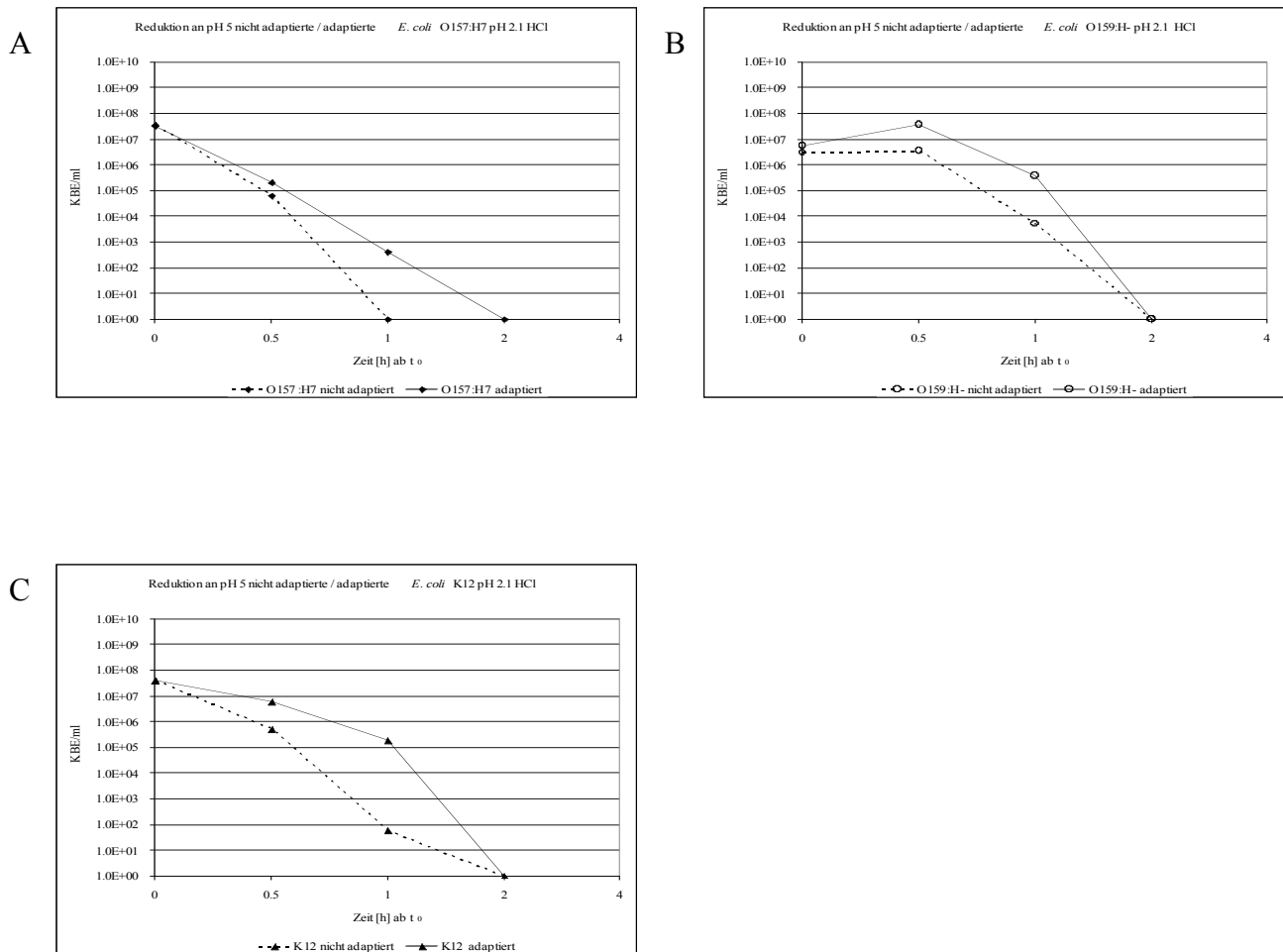


Abbildung 9. Vergleich des Reduktionsverhaltens von adaptierten und nicht adaptierten *E. coli* O157:H7 (A), *E. coli* O159:H⁻ (B) und *E. coli* K12 (C) der stationären Wachstumsphase bei Maximalsäurestress (BHI-Bouillon pH 2.1, Salzsäure). Zur Adaptation wurden die Teststämme vorgängig für 2 h (37°C) in BHI-Bouillon pH 5.0 (Salzsäure) verbracht.

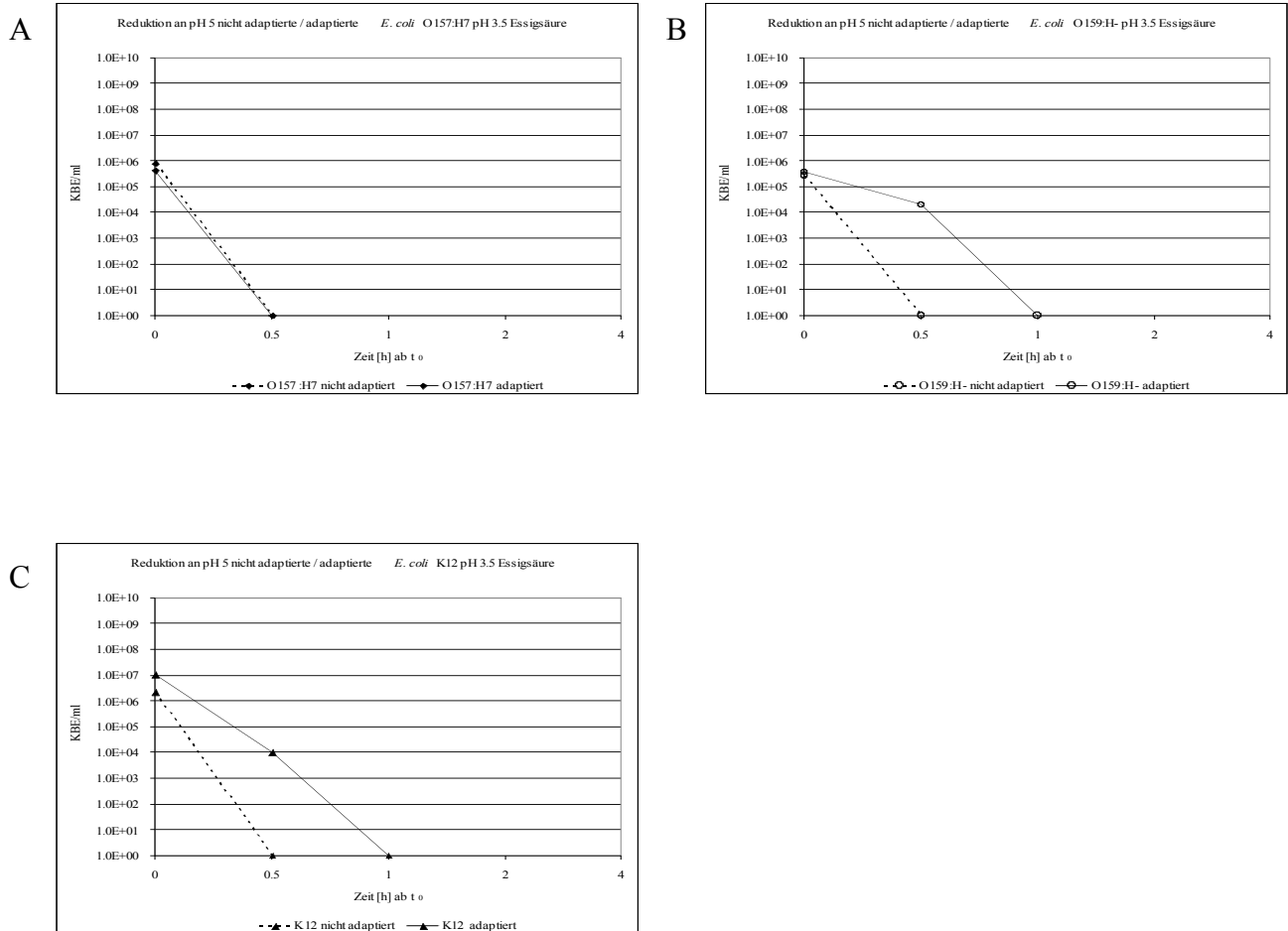


Abbildung 10. Vergleich des Reduktionsverhalten von adaptierten und nicht adaptierten *E. coli* O157:H7 (A), *E. coli* O159:H⁻ (B) und *E. coli* K12 (C) der stationären Wachstumsphase bei Maximalsäurestress (BHI-Bouillon pH 3.5, Essigsäure). Zur Adaptation wurden die Teststämme vorgängig für 2 h (37°C) in BHI-Bouillon pH 5.0 (Essigsäure) verbracht.

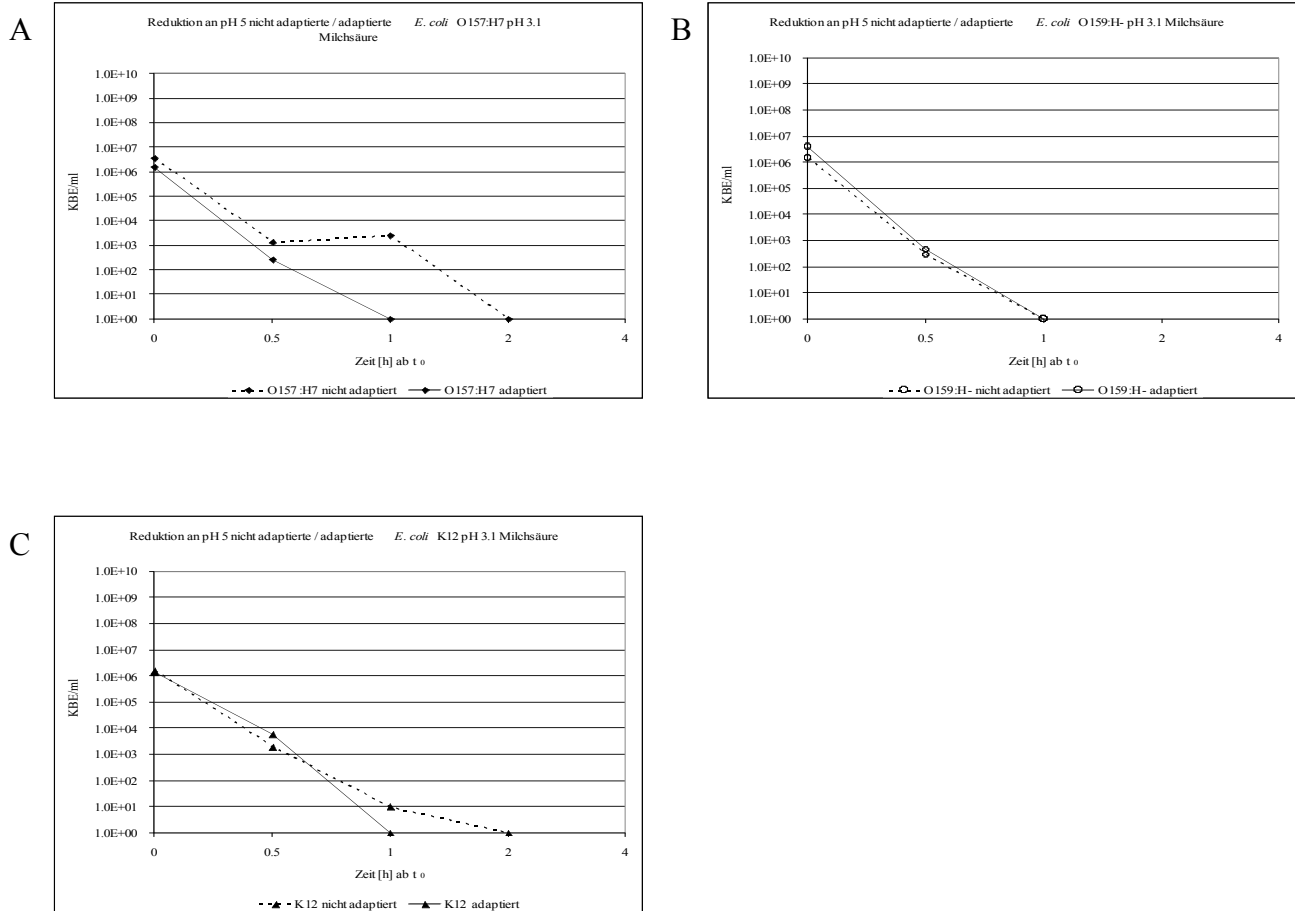


Abbildung 11. Vergleich des Reduktionsverhaltens von adaptierten und nicht adaptierten *E. coli* O157:H7 (A), *E. coli* O159:H⁻ (B) und *E. coli* K12 (C) der stationären Wachstumsphase bei Maximalsäurestress (BHI-Bouillon pH 3.1, Milchsäure). Zur Adaptation wurden die Teststämme vorgängig für 2 h (37°C) in BHI-Bouillon pH 5.0 (Milchsäure) verbracht.

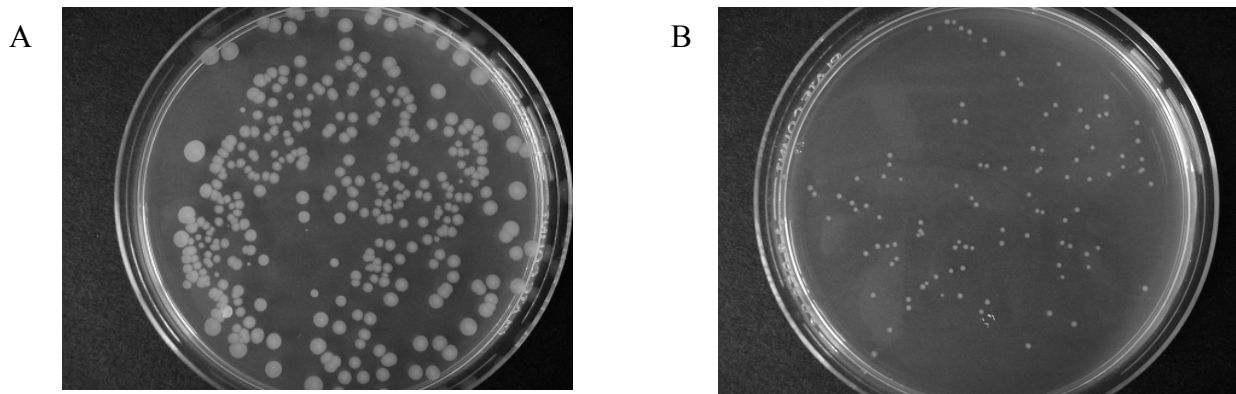


Abbildung 12. Unterschiede in der Koloniegröße von *E. coli* O157:H7 (A) und *E. coli* K12 (B) auf PC-Agar (20 h, 37°C) nach den Reduktionsversuchen in BHI-Bouillon pH 3.5 (Essigsäure). Dabei erwiesen sich die Kolonien von *E. coli* K12 als deutlich kleiner als diejenigen von *E. coli* O157:H7.

7 Literaturverzeichnis

- Abdul-Raouf U.M., Beuchat L.R., Ammar M.S. 1993. Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 in ground, roasted beef as affected by pH, acidulants, and temperature. Appl. Environ. Microbiol. 59:2364-8
- Abee T., Wouters J.A. 1999. Microbial stress response in minimal processing. Int. J. Food Microbiol. 50:65-91
- Ammon A., Petersen L.R., Karch H. 1999. A large outbreak of hemolytic uremic syndrome caused by an unusual sorbitol-fermenting strain of *Escherichia coli* O157:H2. J. Infect. Dis. 179:1274-7
- Arias M.L., Monge-Rojas R., Antillon F., Chaves C. 2001. Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 in meat, poultry and vegetables mixed with different concentrations of mayonnaise. Rev. Biol. Trop. 49:1207-12
- Arnold K.W., Kaspar C.W. 1995. Starvation- and stationary-phase-induced acid tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. Appl. Environ. Microbiol. 61:2037-9
- Auger E.A., Redding K.E., Plumb T., Childs L.C., Meng S.Y., Bennett G.N. 1989. Construction of lac fusions to the inducible arginine- and lysine decarboxylase genes of *Escherichia coli* K12. Mol. Microbiol. 3:609-20
- Bachrouri M., Quinto E.J., Mora M.T. 2002. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 during storage of yogurt at different temperatures. J. Food Sci. 67:1899-903
- Benjamin M.M., Datta A.R. 1996. Acid tolerance of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 61:1669-72
- Bergholz T.M., Whittam T.S. 2007. Variation in acid resistance among enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in a simulated gastric environment. Lett. Appl. Microbiol. 102:352-62
- Berry E.D., Cutter C.N. 2000. Effects of acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 on efficacy of acetic acid spray washes to decontaminate beef carcass tissue. Appl. Environ. Microbiol. 66:1493-8
- Besser R.E., Lett S.M., Weber J.T., Doyle M.P., Barrett T.J., Wells J.G., Griffin P.M. 1993. An outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome from *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-pressed apple cider. JAMA 269:2264-6

- Beutin L., Zimmermann S., Gleier K. 1998. Human infections with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* other than serogroup O157 in Germany. *Emerging Infect. Dis.* 4:635-9
- Beutin L., Krause G., Zimmermann S., Kaulfuss S., Gleier K. 2004. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over a 3-year period. *J. Clin. Microbiol.* 42:1099-108
- Bhagwat A.A., Chan L., Han R., Tan J., Kothary M., Jean-Gilles J., Tall B.D. 2005. Characterization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains based on acid resistance phenotypes. *Infect. Immun.* 73:4993-5003
- Bhagwat A.A., Tan J., Sharma M., Kothary M., Low S., Tall B.D., Bhagwat M. 2006. Functional heterogeneity of RpoS in stress tolerance of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:4978-86
- Boerlin P., Mcewen S.A., Boerlin-Petzold F., Wilson J.B., Johnson R.P., Gyles C.L. 1999. Association between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. *J. Clin. Microbiol.* 37:497-503
- Brown J.L., Ross T., McMeekin T.A., Nichols P.D. 1997. Acid habituation of *Escherichia coli* and the potential role of cyclopropane fatty acids in low pH tolerance. *Int. J. Food Microbiol.* 37:163-73
- Brudzinski L., Harrison M. 1998. Influence of incubation conditions on survival and acid tolerance response of *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157:H7 isolates exposed to acetic acid. *J. Food Prot.* 61:542-6
- Buchanan R.L., Edelson S.G. 1996. Culturing enterohemorrhagic *Escherichia coli* in the presence and absence of glucose as a simple means of evaluating the acid tolerance of stationary-phase cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:4009-13
- Buchanan R.L., Edelson S.G., Boyd G. 1999. Effects of pH and acid resistance on the radiation resistance of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J. Food Prot.* 62:219-28
- Calicioglu M., Faith N.G., Buege D.R., Luchansky J.B. 1997. Viability of *Escherichia coli* O157:H7 in fermented semidry low-temperature-cooked beef summer sausage. *J. Food Prot.* 60:1158-62

- Caro I., García-Armesto M.R. 2007. Occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in a raw Spanish raw ewe's milk cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 116:410-3
- Castanie-Cornet M.P., Penfound T.A., Smith D., Elliott J.F., Foster J.W. 1999. Control of acid resistance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 181:3525-35
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). 1995. *Escherichia coli* O157:H7 outbreak linked to commercially distributed dry-cured salami – Washington and California, 1994. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 44:157-60
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). 1996. Outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 and cryptosporidiosis associated with drinking unpasteurized apple cider - Connecticut and New York. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 46:4-8
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). 1997. Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with drinking unpasteurized commercial apple juice - British Columbia, California, Colorado, and Washington, October 1996. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 45:975
- Chang Y.Y., Cronan J.E. 1999. Membrane cyclopropane fatty acids content is a major factor in acid resistance of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 33:249-59
- Chart H. 2000. VTEC enteropathogenicity. *Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol.* 29:12S-23S
- Cheng C., Kaspar C.W. 1998. Growth and processing conditions affecting acid tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiol.* 15:157-66
- Cheville A.M., Arnold K.W., Buchrieser C., Cheng C.M., Kaspar C.W. 1996. *rpoS* regulation of acid, heat, and salt tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1822-4
- Chung H.J., Bang W., Drake M.A. 2006. Stress response of *Escherichia coli*. *Comp. Rev. Food Sci. Saf.* 5:52-64
- Clavero M.R., Beuchat L.R. 1996. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in broth and processed salami as influenced by pH, water activity, and temperature and suitability of media for its recovery. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:2735-40

- Cody S.H., Glynn M.K., Farrar J.A., Cairns K.L., Griffin P.M., Kobayashi J., Fyfe M., Hoffman R., King A.S., Lewis J.H., Swaminathan B., Bryant R.G., Vugia D.J. 1999. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection from unpasteurized commercial apple juice. *Ann. Intern Med.* 130:202-9
- Conner D.E., Kotrola J.S. 1995. Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 under acidic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:382-5
- De Jonge R., Takumi K., Ritmeester W.S., van Leusden F.M. 2003. The adaptive response of *Escherichia coli* O157 in an environment with changing pH. *J. Appl. Microbiol.* 94:555
- Deng Y., Ryu J., Beuchat L.R. 1999. Tolerance of acid-adapted and non-adapted *Escherichia coli* O157:H7 cells to reduced pH as affected by type of acidulant. *J. Appl. Microbiol.* 86:203-10
- Diez-Gonzalez F., Russell J.B. 1999. factors affecting the extreme acid resistance of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiol.* 16:367-74
- Dineen S.S., Takeuchi K., Soudah J.E., Boor K.J. 1998. Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy fermentation systems. *J. Food Prot.* 61:1602-8
- Dlamini B.C., Buys E.M. 2009. Adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 to acid in traditional and commercial goat milk amasi. *Food Microbiol.* 26:58-64
- Dodd C.E.R., Aldsworth T.G. 2002. The importance of RpoS in the survival of bacteria through food processing. *Int. J. Food Microbiol.* 74:189-94
- Duffy L.L., Grau F.H., Vanderlinde P.B. 2000. Acid resistance of enterohaemorrhagic and generic *Escherichia coli* associated with foodborne disease and meat. *Int. J. Food Microbiol.* 60:83-9
- Edelson S. 1996. Culturing enterohemorrhagic *E. coli* in the presence and absence of glucose as a simple means of evaluating the acid tolerance of stationary-phase cell. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:4009-13
- EFSA (European Food Safety Authority). 2007. The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European Union in 2006. *The EFSA Journal* 130:1-310

- Eklund M., Scheutz F., Siitonen A. 2001. Clinical isolates of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: Serotypes, virulence characteristics, and molecular profiles of strains of the same serotype. J. Clin. Microbiol. 39:2829-34
- Ethelberg S., Smith B., Torpdahl M., Lisby M., Boel J., Jensen T., Nielsen E.M., Molbak K. 2009. Outbreak of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection from consumption of beef sausage. Clin. Infect. Dis. 48:78-81
- Faith N.G., Parniere N., Larson T., Lorang T.D., Kaspar C.W., Luchansky J.B. 1998. Viability of *Escherichia coli* O157:H7 in salami following conditioning of batter, fermentation and drying of sticks, and storage of slices. J. Food Prot. 61:377-82
- Feng P., Lampel K.A., Karch H., Whittam T.S. 1998. Genetic and phenotypic changes in the emergence of *E. coli* O157:H7. J. Infect. Dis. 177:1750-3
- Garren D.M., Harrison M.A., Russell S.M. 1998. Acid tolerance and acid shock response of *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157:H7 isolates provide cross protection to sodium lactate and sodium chloride. J. Food Prot. 61:158-61
- Gawande P.V., Bhagwat A.A. 2002. Protective effects of cold temperature and surface-contact on acid tolerance of *Salmonella* spp. J. Appl. Microbiol. 93:689-96
- Getty K.J.K., Phebus R.K., Marsden J.L., Fung D.Y.C., Kastner C.L. 2000. *Escherichia coli* O157:H7 and fermented sausages: A review. J. Rapid Methods Autom. Microbiol. 8:141-70
- Glass K.A., Laeffelholz J.M., Ford J.P., Doyle M.P. 1992. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 as affected by pH or sodium chloride in fermented, dry sausage. Appl. Environ. Microbiol. 58:2513-6
- Goodson M., Rowbury R.J. 1989. Habituation to normally lethal acidity by prior growth of *Escherichia coli* at a sub-lethal acid pH value. Lett. Appl. Microbiol. 8:77-9
- Griffin P.M., Tauxe R.V. 1991. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. Epidemiol. Rev. 13:60-98
- Guilfoyle D.E., Hirshfield I.N. 1996. The survival benefit of short-chain organic acids and the inducible arginine and lysine decarboxylase genes for *Escherichia coli*. Appl. Microbiol. 22:393-6

- Gulmez M., Guven A. 2003. Survival of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* 4b and *Yersinia enterocolitica* O3 in different yogurt and kefir combinations as prefermentation contaminant. J. Appl. Microbiol. 95:631-6
- Han Y., Linton R.H. 2004. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in strawberry juice and acidified media at different pH values and temperatures. J. Food Prot. 67:2443-9
- Hathcox A.K., Beuchat L.R., Doyle M.P. 1995. Death of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in real mayonnaise and reduced-calorie mayonnaise dressing as influenced by initial population and storage temperature. Appl. Environ. Microbiol. 61:4172-7
- Hengge-Aronis R. 2002. Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the σ^S (RpoS) subunit of RNA Polymerase. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 66:373-95
- Hersh B.M., Farooq F.T., Barstad D.N., Blankenshorn D.L., Slonczewski J.L. 1996. A glutamate-dependent acid resistance gene in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 178:3978-81
- Hilborn E.D., Mshar P.A., Fiorentino T.R., Dembek Z.F., Barrett T.J., Howard R.T., Carter M.L. 2000. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections and haemolytic uraemic syndrome associated with consumption of unpasteurized apple cider. Epidemiol. Infect. 124:31-6
- Hovde C.J., Austin P.R., Cloud K.A., Williams C.J., Hunt C.W. 1999. Effect of cattle diet on *Escherichia coli* O157:H7 acid resistance. Appl. Environ. Microbiol. 65:3233-5
- Hsin-Yi C., Chou C.C. 2001. Acid adaptation and temperature effect on the survival of *E. coli* O157:H7 in acidic fruit juice and lactic fermented milk product. Int. J. Food Microbiol. 70:189-95
- Johnson R.P., Clarke R.C., Wilson J.B., Read S.C., Rahn K., Renwick S.A., Sandhu K.A., Alves D., Karmali M.A., Lior H., Mcewen S.A., Spika J.S., Gyles C.L. 1996. Growing concerns and recent outbreaks involving non-O157:H7 serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli*. J. Food Prot. 59:1112-22
- Johnson K.E., Thorpe C.M., Sears C.L. 2006. The emerging clinical importance of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. Clin. Infect. Dis. 43:1587-95

- Jordan K.N., Oxford L., O'Byrne C. 1999. Survival of low-pH stress by *Escherichia coli* O157:H7: Correlation between alterations in the cell envelope and increased acid tolerance. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:3048-55
- Karch H., Tarr P.I., Bielaszewska M. 2005. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human medicine. *Int. J. Med. Microbiol.* 295:405-18
- Karmali M.A. 1989. Infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 2:15-38
- Koodie L., Dhople A.M. 2001. Acid tolerance of *Escherichia coli* O157:H7 and its survival in apple juice. *Microbios* 104:167-75
- Koutsoumanis K.P., Sofos J.N. 2004. Comparative acid stress response of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium after habituation at different pH conditions. *Lett. Appl. Microbiol.* 38:321-6
- Kreske A.C., Bjornsdottir K., Breidt jr. F., Hassan H. 2008. Effects of pH, dissolved oxygen, and ionic strength on the survival of *Escherichia coli* O157:H7 in organic acid solutions. *J. Food Prot.* 71:2404-0
- Lange R., Hengge-Aronis R. 1991. Identification of a central regulator of stationary-phase gene expression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 5:49-59
- Large T.M., Walk S.T., Whittam T.S. 2005. Variation in acid resistance among Shiga toxin-producing clones of pathogenic *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:2493-500
- Lease R.A., Smith D., McDonough K., Belfort M. 2004. The small noncoding DsrA RNA is an acid resistance regulator in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 186:6179-85
- Lee S.M., Chen J. 2004. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in set yogurt as influenced by the production of an exopolysaccharide, colanic acid. *J. Food Prot.* 67:252-5
- Leyer G.J., Wang L., Johnson E.A. 1995. Acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 increases survival in acidic foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:3752-5

- Lin J., Lee I.S., Frey J., Slonczewski J.L., Foster J.W. 1995. Comparative analysis of extreme acid survival in *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, and *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 177:4097-104.
- Lin J., Smith M.P., Chapin K.C., Baik H.S., Bennett G.N., Foster J.W. 1996. Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 62:3094-100
- Loewen P.C., Hengge-Aronis R. 1994. The role of the sigma factor sigma S (KatF) in bacterial global regulation. Annu. Rev. Microbiol. 48:53-80
- Loewen P.C., Hu B., Strutinsky J., Sparling R. 1998. Regulation in the *rpoS* regulon of *Escherichia coli*. Can. J. Microbiol. 44:707-17
- MacDonald I.A.R., Gould I.M., Curnow J. 1996. Epidemiology and infection due to *E. coli* O157:H7: A 3-year prospective study. Epidemiol. Infect. 116:2879-84
- MacDonald D.M., Fyfe M., Paccagnella A., Trinidad A., Louie K., Patrick D. 2004. *Escherichia coli* O157:H7 outbreak linked to salami, British Columbia, Canada, 1999. Epidemiol. Infect. 132:283-9
- Maher M.M., Jordan K.N., Upton M.E., Coffey A. 2001. Growth and survival of *E. coli* O157:H7 during the manufacture and ripening of a smear-ripened cheese produced from raw milk. J. Appl. Microbiol. 90:201-7
- Mao Y., Doyle M.P., Chen J. 2006. Role of colanic acid exopolysaccharide in the survival of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in simulated gastrointestinal fluids. Lett. Appl. Microbiol. 42:642-7
- Massa S., Altieri C., Quaranta V., De Pace R. 1997. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in yoghurt during preparation and storage at 4°C. Lett. Appl. Microbiol. 24:347-50
- McKellar R.C., Knight K.P. 1999. Growth and survival of various strains of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in hydrochloric acetic acid. J. Food Prot. 62:1466-9
- Mead P.S., Finelli L., Lambert Fair M.A., Champ D., Townes J., Hutwagner L., Barrett T., Spitylny D., Mintz E. 1997. Risk factors for sporadic infections with *E. coli* O157:H7. Arch. Intern. Med. 157:204-8

- Michino H., Araki K., Minami S., Takaya S., Sakai N., Miyazaki M., Ono A., Yanagawa H. 1999. Massive outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in schoolchildren in Sakai City, Japan, associated with consumption of white radish sprouts. *Am. J. Epidemiol.* 150:797-803
- Miller L.G., Kaspar C.W. 1994. *Escherichia coli* O157:H7 acid tolerance and survival in apple cider. *J. Food Prot.* 57:460-4
- Molina P.M., Parma A.E., Sanz M.E. 2003. Survival in acidic and alcoholic medium of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157:H7 isolated in Argentina. *BMC Microbiol.* 3:17
- Montet M.P., Christieans S., Thevenot D., Coppet V., Ganet S., Deligente Muller M.L., Dunière L., Mischczycha S., Vernozzy-Rozand C. 2009. Fate of acid-resistant and non-acid resistant Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in experimentally contaminated French fermented raw meat sausages. *Int. J. Food Microbiol.* 129:264-70
- Moon K.D., Delaquis P., Toivonen P., Bach S., Stanich K., Harris L. 2006a. Destruction of *Escherichia coli* O157:H7 by vanillic acid in unpasteurized juice from six apple cultivars. *J. Food Prot.* 69:542-7
- Moon K.D., Delaquis P., Toivonen P., Stanich K. 2006b. Effect of vanillin on the fate of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in a model apple juice medium and in apple juice. *Food Microbiol.* 23:169-74
- Morgan D., Newman C.P., Hutchinson D.N., Walker A.M., Rowe B., Majid F. 1993. Verotoxin producing *Escherichia coli* O157 infections associated with the consumption of yoghurt. *Epidemiol. Infect.* 111:181-7
- Mutaku I., Erku W., Ashenafi M. 2005. Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 in fresh tropical fruit juices at ambient and cold temperatures. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 56:133-9
- Naim F., Messier S., Saucier L., Piette G. 2004. Postprocessing in vitro digestion challenge to evaluate survival of *Escherichia coli* O157:H7 in fermented dry sausage. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:6637-42
- Nataro J.P., Kaper J.B. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11: 142-201
- Nystrom T. 2004. Stationary-phase physiology. *Annu. Rev. Microbiol.* 58:161-81

- Ogwaro B.A., Gibson H., Whitehead M., Hill D.J. 2002. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in traditional African yoghurt fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 79:105-12
- Oh D., Pan Y., Berry E., Cooley M., Mandrell R., Breidt jr. F. 2009. *Escherichia coli* O157:H7 strains isolated from environmental sources differ significantly in acetic acid resistance compared with human outbreak strains. *J. Food Prot.* 72:503-9
- Oyarzabal O.A., Nogueira M.C., Gombas D.E. 2003. Survival of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* in juice concentrates. *J. Food Prot.* 66:1595-8
- Paton A.W., Ratcliff R., Doyle R.M., Seymour-Murray J., Davos D., Lanser J.A., Paton J.C. 1996. Molecular microbiological investigation of an outbreak of hemolytic uremic syndrome caused by fermented sausage contaminated with Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 34:1622-7
- Perna N.T., Mayhew G.F., Posfai G., Elliott S., Sonnenberg M.S., Karper J.B. 1998. Molecular evolution of a pathogenicity island from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect. Immun.* 66:3810-7
- Pozzi W., Beutin L., Weber H. 1996. Überleben und Nachweis von enterohämorrhagischen *Escherichia coli* in streichfähiger Rohwurst. *Fleischwirtsch.* 76:1300-11
- Price S.B., Cheng C., Kaspar C.W., Wright J.C., DeGraves F.J., Penfound T.A., Castanie-Cornet M., Foster J.W. 2000. Role of *rpoS* in acid resistance and fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:632-7
- Price S.B., Wright J.C., DeGraves F.J., Castanie-Cornet M.P., Foster J.W. 2004. Acid resistance systems required for survival in the bovine gastrointestinal tract and in apple cider are different. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:4792-9
- Riley L.Q., Remis R.S., Helgerson S.D., McGee H.B., Wells J.G., Davis B.R., Herbert R.J., Olcott E.S., Johnson L.M., Hargrett N.T., Blake P.A., Cogen M.L. 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N. Engl. J. Med.* 308:681-5
- Riordan D.C.R., Duffy G., Sheridan J.J., Whiting R.C., Blair I.S., McDowell D.A. 2000. Effects of acid adaptation, product pH, and heating on survival of *Escherichia coli* O157:H7 in Pepperoni. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:1726-9

- Roering A.M., Luchansky J.B., Ihnot A.M., Ansay S.E., Kaspar C.W., Ingham S.C. 1999. Comparative survival of *Salmonella typhimurium* DT104, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157:H7 in preservative-free apple cider as simulated gastric fluid. *Int. J. Food Microbiol.* 46:263-9
- Ryu J.H., Beuchat L.R. 1998. Influence of acid tolerance responses on survival, growth, and thermal cross-protection of *Escherichia coli* O157:H7 in acidified media and fruit juices. *Int. J. Food Microbiol.* 45:185-93
- Ryu J.H., Deng Y., Beuchat L.R. 1999. Behaviour of acid-adapted and unadapted *E. coli* O157:H7 when exposed to reduced pH achieved with various organic acids. *J. Food Prot.* 62:451-5
- Sainz T., Perez J., Villaseca J., Hernandez U., Eslava C., Mendoza G., Wachter C. 2005. Survival to different acid challenges and outer membrane protein profiles of pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from pozol, a Mexican typical maize fermented food. *Int. J. Food Microbiol.* 105:357-67
- Samelis J., Sofos J.N., Kendall P.A., Smith G.C. 2005. Survival or growth of *Escherichia coli* O157:H7 in a model system of fresh meat decontamination runoff waste fluids and its resistance to subsequent lactic acid stress. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:6228-34
- Sartz L., De Jong B., Hjertqvist M., Plym-Forsell L., Alsterlund R., Löfdahl S., Ostermann B., Stahl A., Eriksson E., Hansson H.B., Karpman D. 2008. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in southern Sweden associated with consumption of fermented sausage; aspects of sausage production that increase the risk of contamination. *Epidemiol. Inf.* 136:370-80
- Schimmer B., Nygard K., Eriksen H., Lassen J., Lindstedt B., Brandal L.T., Kapperud G., Aavitsland P. 2008. Outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Norway caused by *stx*₂-positive *Escherichia coli* O103:H25 traced to cured mutton sausages. *BMC Infect. Dis.* 8:41
- Schlesser J.E., Gerdes R., Ravishankar S., Madsen K., Mowbray J., Teo A.Y. 2006. Survival of a five-strain cocktail of *Escherichia coli* O157:H7 during the 60-day aging period of cheddar cheese made from unpasteurized milk. *J. Food Prot.* 69:990-8
- Semanchek J.J., Golden D.A. 1996. Survival of *E. coli* O157:H7 during fermentation of apple cider. *J. Food Prot.* 59:1256-9

- Sharma M., Adler B.B., Harrison M.D., Beuchat L.R. 2005. Thermal tolerance of acid-adapted and unadapted *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes* in cantaloupe juice and watermelon juice. *Lett. Appl. Microbiol.* 41:448-53
- Sharma M., Richards G.M., Beuchat L.R. 2004. Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 in roast beef and salami after exposure to an alkaline cleaner. *J. Food Prot.* 67:2107-16
- Slutsker L., Ries A.A., Greene K.D., Wells J.G., Hutwagner L., Griffin P.M. 1997. *E. coli* O157:H7 diarrhea in United States: Clinical and epidemiologic features. *Ann. Intern. Med.* 126:505
- Small P., Blankenhorn D., Welty D., Zinser E., Slonczewski L. 1994. Acid and base resistance in *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*: Role of *rpoS* and growth pH. *J. Bacteriol.* 176:1729-37
- Smith D.K., Kassam T., Singh B., Elliott J.F. 1992. *Escherichia coli* has two homologous glutamate decarboxylase genes that map to distinct loci. *J. Bacteriol.* 174:5820-6.
- Steele B.T., Murphy N., Arbus G.S., Rance C.P. 1982. An outbreak of hemolytic uremic syndrome associated with ingestion of fresh apple juice. *J. Pediatr.* 101:963-5
- Stopforth J.D., Skandamis P.N., Geornaras I., Sofos J.N. 2007. Acid tolerance of acid-adapted and nonacid-adapted *Escherichia coli* O157:H7 strains in beef decontamination runoff fluids or on beef tissue. *Food Microbiol.* 24:530-8
- Tamblyn S., de Grosbois J., Taylor D., Stratton J. 1999. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with unpasteurized non-commercial, custom-pressed apple cider - Ontario, 1998. *Can. Commun. Dis. Rep.* 25:113-7
- Tamplin M.L. 2005. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in simulated gastric fluid. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:320-5
- Tarr P.I., Neill M.A. 1996. Perspective: the problem of non-O157:H7 shiga toxin producing *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 174:1136-9
- Tarr P.I., Gordon C.A., Chandler W.L. 2005. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *Lancet* 365:1073-86
- Teunis P., Takumi K., Shinagawa K. 2004. Dose response for infection by *Escherichia coli* O157:H7 from outbreak data. *Risk Analysis* 24:401-7

- Tilden J., Young W., McNamara A., Custer C., Boesel B., Lambert-Fair M.A., Majkowski J., Vugia D., Werner S.B., Hollingsworth J., Morris J.G. 1996. A new route of transmission for *Escherichia coli*: Infection from dry fermented salami. Am. J. Publ. Health 86:1142-5
- Tsai Y., Ingham S.C. 1997. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. in acidic condiments. J. Food Prot. 60:751-5
- Tsegaye M., Ashenafi M. 2005. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 during the processing and storage of Ergo and Ayib, traditional Ethiopian dairy products. Int. J. Food Microbiol. 103:11-21
- Tuttle J., Gomez T., Doyle M.P., Wells J.G., Zhao T., Tauxe R.V., Griffin P.M. 1999. Lessons from a large outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections: Insights into the infectious dose and method of widespread contamination of hamburger patties. Epidemiol. Infect. 122:185-92
- Vaara M. 1992. Agents that increase the permeability of the outer membrane. Microbiol. Rev. 56:395-411
- Vernozy-Rozand C., Mazuy-Cruchaudet C., Bavai C., Montet M.P., Bonin V., Dernburg A., Richard Y. 2005a. Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture and ripening of raw goat milk lactic cheeses. Int. J. Food Microbiol. 105:83-8
- Vernozy-Rozand C., Montet M.P., Berardin M., Bavai C., Beutin L. 2005b. Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from raw milk cheeses in France. Appl. Microbiol. 41:235-41
- Waterman S., Small P. 1996. Characterization of the acid resistance phenotype and *rpoS* alleles of Shiga-like toxin-producing *E. coli*. Infect. Immun. 64:2808-11
- Weagant S.D., Bryant J.L., Bark D.H. 1994. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in mayonnaise-based sauces at room and refrigerated temperatures. J. Food Prot. 57:629-31
- Weber H., Polen T., Heuveling J., Wendisch V.F., Hengge R. 2005. Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*: σ^S -dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity. J. Bacteriol. 187:1591-603
- Werber D., Behnke S.C., Fruth A., Merle R., Menzler S., Glaser S., Kreienbrock L., Prager R., Tschäpe H., Roggentin P., Bockemühl J., Ammon A. 2007. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in Germany-different risk factors for different age groups. Am. J. Epidemiol. 165:425-34

- Whiting R.C., Golden M.H. 2002. Variation among *Escherichia coli* O157:H7 strains relative to their growth, survival, thermal inactivation, and toxin production in broth. *Int. J. Food Microbiol.* 75:127-33
- Whittam T.S., Wilson R.A. 1988. Genetic relationships among pathogenic *E. coli* of serogroup O157. *Infect. Immun.* 56:2467-73
- Williams R.C., Isaacs S., Decou M.L., Richardson E.A., Buffett M.C., Slinger R.W., Brodsky M.H., Ciebin B.W., Ellis A., Hockin J. 2000. Illness outbreak associated with *Escherichia coli* O157:H7 in Genoa salami. *E. coli* O157:H7 Working Group. *CMAJ* 162:1409-13
- Yoshida T., Yamashino T., Ueguchi C., Mizuno T. 1993. Expression of the *Escherichia coli* dimorphic glutamic acid decarboxylases is regulated by the nucleoid protein H-NS. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 57:1568-9
- Yuk H.G., Marshall D.L. 2004. Adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 to pH alters membrane lipid composition, Verotoxin secretion, and resistance to simulated gastric fluid. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:3500-5
- Yuk H.G., Marshall D.L. 2005. Influence of acetic, citric, and lactic acids on *Escherichia coli* O157:h7 membrane lipid composition, Verotoxin secretion, and acid resistance in simulated gastric fluid. *J. Food Prot.* 68:673-9
- Yukioka H., Kurita S. 1997. *Escherichia coli* O157 disaster in Japan, 1996. *Eur. J. Emerg. Med.* 4:165
- Zhao T., Doyle M. 1994. Fate of enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7 in commercial mayonnaise. *J. Food Prot.* 57:780-3
- Zhao T., Doyle M., Besser R. 1993. Fate of enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7 in apple cider with and without preservatives. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:2526-30
- Zweifel C., Rusch M., Corti S., Stephan R. 2006. Untersuchungen zu verschiedenen mikrobiologischen Parametern in Rohmilch und Rohmilchkäse einer Biokäsereigenossenschaft. *Arch. Lebensmittelhyg.* 57:13-6

8 Dank

Ich möchte mich bei all denen bedanken, die zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben, im Besonderen:

Herrn Prof. Dr. Roger Stephan danke ich für die Überlassung der interessanten Dissertations-Thematik und die stetige Unterstützung bis zum Abschluss der Arbeit

Frau PD Dr. Barbara Schalch danke ich für die Übernahme des Korreferats

PD Dr. Claudio Zweifel danke ich für seinen ausserordentlichen Einsatz zum Abschluss der Arbeit und seine hilfreichen Hinweise

Dr. Taurai Tasara danke ich für seine Gesellschaft und seine kompetenten Antworten auf meine Fragen

Frau Marlen Lüscher danke ich für ihre zielgerichtete Abwicklung der Anstellungsformalitäten

Herrn Jerzy Giletycz danke ich für die zeitgerechte Versorgung mit allen Nährmedien

Allen Angehörigen vom ILS danke ich für das freundliche Arbeitsklima und die entgegengebrachte Hilfsbereitschaft

Tanja und Frank Nauer danke ich für ihre geschwisterliche Unterstützung

Kathrin Scheu danke ich, dass es Dich gibt

Lebenslauf

Name	Timo Marc, Nauer
Geburtsdatum	5. Juli 1977
Geburtsort	Bern
Nationalität	Schweizer
Heimatort	Unteriberg SZ

1984 – 1989	Primarschule in Bottmingen BL
1989 – 1993	Progymnasium in Binningen BL
1993 – 1996	Gymnasium in Oberwil BL
1996	Matura Typ B

1998 – 2000	Studium der Veterinärmedizin an der Universität Basel, Schweiz
2000 – 2004	Studium der Veterinärmedizin an der Universität Zürich, Schweiz
2004	Staatsexamen an der Universität Zürich, Schweiz

2005 – 2009	praktizierender Tierarzt (Teilpensum) in der Gross- und Kleintierpraxis C. Kiefer, Wangen a/A BE
2005 – 2006	praktizierender Tierarzt (Teilpensum) in der Gross- und Kleintierpraxis Dr. F. Stampfli, Balsthal SO
2006 – 2007	Doktorand, Institut für Lebensmittelsicherheit und –hygiene der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich, Schweiz
2007 – 2009	praktizierender Tierarzt (Teilpensum) in der Gross- und Kleintierpraxis Dres. Luder und Unternährer, Langenthal BE